BOURGEOIS CLAUDE MARCEL

PARIJS

1972

INFLUENCE DE LA LYSINE SUR LA CROISSANCE ET SUR LE METABOLISME DE L'ARGININE ET DES POLYAMINES CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

UNIVERSITE PARIS VII.

BOURGEOIS Claude Marcel

Thèse de Sciences Naturelles

INFLUENCE DE LA LYSINE SUR LA CROISSANCE ET LE METABOLISME DE L'ARGININE ET DES POLYAMINES CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

Soutenance le 27 septembre 1972

Jury : M. F. CHAPEVILLE, Président

Mme H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, Examinateur

M. F. LACROUTE, Examinateur

M. J.M. CLEMENT, Examinateur.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents,

A ma femme.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550025_0033

AVANT PROPOS.

C'est avec joie que je salue la présence dans ce jury, en qualité de Président, de Monsieur le Professeur F. CHAPEVILLE ; je lui dois mon initiation à la biochimie lors d'un stage de DES déjà ancien, effectué au CEN de SACLAY ; je le remercie aussi d'avoir accepté, après ces longues années que j'ai passées en dehors des laboratoires, de m'accorder à nouveau son patronnage.

A Madame H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, maître de recherche, j'exprime ma profonde gratitude pour m'avoir dès le début de ce travail, comblé de ses encouragements, éclairé de ses critiques et guidé de ses conseils.

Je remercie également Monsieur le Professeur F. LACROUTE d'avoir accepté de s'intéresser à mes recherches et de participer à ce jury malgré les difficultés que cela lui créait.

Je suis reconnaissant aussi à tous les professeurs et chercheurs qui m'ont aidé soit en acceptant de discuter de mon travail, soit en m'ouvrant leur laboratoire, je pense en particulier à Monsieur le Professeur L. CHAPON, de l'Université de Nancy I et à Monsieur le Professeur G. SIEST, Directeur de l'UER Alimentation-Nutrition, ainsi qu'à mon collègue et ami B. CHOLLOT. Je profite de l'occasion pour signaler aussi l'intérêt qu'a eu pour moi une collaboration de trois années avec D. THOUVENOT, collaboration qui je l'espère se poursuivra longtemps.

Aux Directeurs successifs de l'Ecole de Brasserie, je dois de m'avoir offert les conditions de travail, qui m'ont permis de poursuivre ces recherches ; je suis particulièrement reconnaissant au regretté Doyen URION de m'avoir ouvert les portes de son école et de m'y avoir offert des fonctions passionnantes, et à Monsieur J.M. CLEMENT pour l'enthousiasme et le dynamisme qu'il fait règner dans notre nouvelle école, l'ENSAIA, ainsi que pour les responsabilités qu'il m'y a conférées.

J'adresse encore de chaleureux remerciements à tous ceux dont l'aide m'a été si précieuse dans la réalisation de ce travail, c'est-à-dire à tout le personnel de l'Ecole de Brasserie, avec une mention spéciale pour Madame L. HAROUX, Monsieur G. LOUIS, et surtout Mademoiselle D. ERBS dont la conscience professionnelle et la haute competence technique m'ont été d'un si grand secours ; j'ai d'ailleurs bénéficié également d'aides extérieures à notre Ecole et j'ai particulièrement apprécié le dévouement du personnel de la bibliothèque de Médecine.

Tout le secrétariat relatif à cette thèse et aux publications afférentes a été assuré par ma femme, à l'exception de l'exécution de la frappe finale de ce mémoire dont je suis reconnaissant à Mademoiselle M.L. PETIT DIDIER.

Je ne terminerai pas sans reconnaître ce que je dois à la Brasserie Française ; le Centre Technique m'a maintes fois aidé et j'en suis reconnaissant à son Directeur B. DEYMIE ; je n'oublie pas non plus que l'aide matérielle des brasseurs français contribue de façon sensible au maintien dans notre Ecole de conditions favorables à la recherche et je les en remercie vivement.

S O M M A I R E

INTRODUCTION.

Chapître I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES DE BASE.

I.I - Le transport des aminoacides et leur distribution intracellulaire.

I.2 - La lysine.

I.2.I. - La biosynthèse et sa régulation
I.2.2. - Etude comparée de la faculté d'assimiler la lysine.
I.2.3. - La dégradation et sa régulation.
I.2.4. - Les effets métaboliques.

I.3 - L'arginine et l'ornithine.

I.3.I. - La biosynthèse et sa régulation
I.3.2. - Le catabolisme et sa régulation.
I.3.3. - Relations entre l'anabolisme et le catabolisme

I.4 - Les diamines et polyamines.

I.4.I. - Généralités
I.4.2. - La biosynthèse et sa régulation
I.4.3. - Effets biologiques
I.4.4. - Effets sur le métabolisme des RNA et des protéines.

Chapître II - MATERIEL ET METHODES.-

2.I - Techniques microbiologiques et génétiques.

2.I.I. - Cultures.
2.I.2. - Production et caractérisation de mutants.
2.I.3. - Etude génétique des mutants; hybridations.
2.I.4. - Nomenclature.

2.2 - Techniques biochimiques.-

2.2.I. - Dosages d'azote et de protéines
2.2.2. - Analyses et dosages de métabolites.
2.2.3. - Etude de l'entrée des acides aminés à l'aide de produits marqués.
2.2.4. - Synthèse des macromolécules.
2.2.5. - Essais enzymatiques.

.....

Chapître III - MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DE L'EFFET DE LA LYSINE SUR LA CROISSANCE.-

3.I. - Mise en évidence et étude de l'effet sur la croissance étudiée par turbidimétrie.

3.I.I. - Influence des concentrations en sulfate d'ammonium et en glucose.
3.I.2. - Influence de quelques autres facteurs.
3.I.3. - Généralités du phénomène.

3.2. - Etude de la croissance post-exponentielle en absence et en présence de lysine.

3.2.I. - Signification de la phase post-exponentielle et localisation de l'effet de la lysine au cours de la croissance.

3.2.2. - Comportement des cellules au cours de la phase post-exponentielle.

3.3. - L' "effet lysine" en phase exponentielle. Action de L ∝ - aminodipate.

3.4. - Conclusion et discussion du chapître III.

Chapître IV - INFLUENCE DE LA LYSINE SUR LE METABOLISME DE L'ARGININE ET DE L'ORNITHINE.-

4.I. - Etude de l'évolution des concentrations intra et extra cellulaires des acides aminés au cours de la croissance.-

4.I.I. - Globalement
4.I.2. - L'évolution des concentrations individuelles des acides aminés.

4.2. - Etude des effets de la lysine sur l'arginase et l'ornithine transaminase.-

4.2.I. - Dérepression de l'arginase et de l'ornithine transaminase par la L-lysine.
4.2.2. - Inhibition de l'arginase par la L-lysine.
4.2.3. - Etude de la dérepression post-exponentielle de mutants lysine- .

4.3. - Discussion du chapître IV.

.....

Chapître V - RECHERCHE SYSTEMATIQUE DE L'ORIGINE DE L'EFFET DE LA LYSINE SUR LA CROISSANCE PAR ISOLEMENT ET ANALYSE DE DIFFERENTS MUTANTS.-

5.I - Localisation de l'origine de l'inhibition dans le métabolisme de l'arginine.

5.2 - Exclusion de l'effet sur le catabolisme en tant que cause de l'inhibition.

5.3 - Recherche de l'origine de l'inhibition dans un effet sur la biosynthèse de l'ornithine.

5.4 - Sélection directe de mutants résistants à l'effet de la L-lysine.

5.5 - Discussion du chapître V.

Chapître VI - RELATIONS ENTRE EFFET LYSINE, BIOSYNTHESE DES POLYAMINES, BIOSYNTHESE DES RNA ET DES PROTEINES.-

6.I - Protection contre l'effet lysine par addition de polyamines au milieu.-

6.2 - Analyse des polyamines intracellulaires pendant la croissance en absence et en présence de lysine.

6.3 - Essais d'identification des polyamines intracellulaires.

6.4 - Relations entre lysine, modification du spectre des polyamines et effet sur la croissance.

6.5. - Discussion du chapître VI.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS.-

I N T R O D U C T I O N

Le comportement de Saccharomyces cerevisiae vis-à-vis de la L-lysine est original à maints égards : c'est d'abord le seul acide aminé que la levure ne peut utiliser comme source d'azote unique; d'autre part, la L-lysine intervient dans la régulation du métabolisme d'acides aminés biosynthétisés tout à fait indépendamment d'elle-même.

Ces faits nous ont incités à étudier de façon plus approfondie les effets métaboliques de la L-lysine chez S. cerevisiae. En premier lieu, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur de cet acide aminé sur l'accroissement cellulaire post-exponentiel.

Pensant que cette inhibition ne représentait que l'exagération d'un phénomène de régulation naturel, nous avons recherché son origine et l'avons localisée dans le métabolisme de l'arginine et de l'ornithine. La constatation d'une baisse importante du pool de l'arginine en présence de lysine nous a conduits à rechercher et à mettre en évidence un effet inducteur marqué sur l'arginase et l'ornithine transaminase.

Après avoir constaté que cette induction n'était pas l'origine de l'inhibition de croissance, nous avons montré l'importance essentielle de la carence en ornithine et en avons localisé la cause au niveau de l'enzyme catalysant la première réaction de biosynthèse en partant du glutamate.

Poursuivant l'analyse, nous avons montré que la présence de lysine introduisait des perturbations dans le métabolisme des polyamines, normalement branché sur la chaîne de l'arginine au niveau de l'ornithine. Après avoir mis en évidence un produit n'apparaissant qu'en présence de lysine et en fin de phase exponentielle, nous avons recherché les conséquences de cette perturbation dans le métabolisme des RNA et des protéines et en avons tiré un certain nombre d'hypothèses concernant la signification physiologique réelle du phénomène découvert.

CHAPITRE 1 - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES DE BASE.

Notre travail nous a amenés à examiner les données bibliographiques relatives à plusieurs questions. Ces analyses bibliographiques seront plus ou moins développées en fonction de leur plus ou moins grande importance pour la résolution du problème étudié. L'accent sera mis sur ce qui concerne les Champignons et plus spécialement S. cerevisiae, avec toutefois des indications de biochimie comparée.

I.I. LE TRANSPORT DES AMINOACIDES ET LEUR DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE.-

Après l'introduction de la notion de perméase (Rickenberg et al . I956; Cohen et Monod I957), des doutes subsistaient quant à sa généralité. Cette notion établie chez les Bactéries fut ensuite étendue progressivement aux autres organismes et en particulier aux Levures (Halvorson et Cohen I958; Surdin et al . I964, I965). Mais chez ces levures, comme d'ailleurs chez d'autres Champignons, les perméases semblaient présenter une spécificité très inférieure à celle constatée chez les Bactéries, l'entrée d'un acide aminé étant inhibée par de nombreux autres; les derniers auteurs cités ont de plus isolé un mutant aap présentant une aminoacide — perméase déficiente dont l'activité de transport de tous les aminoacides est IO fois inférieure à la normale. Le problème fut ensuite étudié par Grenson et al . (I966); Grenson (I966) Gits et Grenson (I967); Grenson et al . (I970); ces importants travaux apportent en particulier des informations précieuses au sujet des acides aminés qui nous intéressent particulièrement, à savoir la lysine, l'arginine et ceux qui sont apparentés à chacun d'eux. Une synthèse de ce qui concerne spécialement la lysine a été publiée par Divies et Morfaux (I968).

Il existe d'abord un certain nombre de systèmes perméasiques plus ou moins spécifiques. L'arginine pénètre grâce à un système partiellement spécifique (Km = IO^{-5} M) qui permet

....

aussi l'entrée d'autres acides aminés basiques tels que la lysine ou l'ornithine à l'égard desquels son affinité est plus faible (Km lysine = 2. 10^{-4} M ; Km ornithine = 3. 10^{-3} M) Des mutants dépourvus de ce système ont été isolés et baptisés arg-p1. La lysine possède elle-même un système d'entrée différent du précédent et hautement spécifique (Km = 2,5.10^{-5} M); sa perte par mutation chez les lys-p1 n'affecte pratiquement que le prélèvement de la lysine . L'acide α-aminoadipique précurseur de la L-lysine qui a été utilisé au cours de certaines de nos expériences, pénètre grâce à un système assurant également l'entrée de deux autres acides dicarboxyliques, l'acide aspartique et l'acide glutamique (Joiris et Grenson I968). D'autres perméases qui ne nous intéressent pas directement ont été mises en évidence.

La régulation de ces systèmes spécifiques, qui a été partiellement étudiée, semble assez diverse. L'inhibition de l'activité perméasique par l'acide aminé concerné semble en être le mécanisme le plus général : il a été mis en évidence pour l'histidine (Crabeel et Grenson I970), et pour la leucine (Bussey et Umberger I970) chez S. cerevisiae. La perméase de la proline étudiée chez S. chevalieri (Schwencke et Magana-Schwencke I969) et sur un plan plus appliqué chez S. cerevisiae dans notre laboratoire (Duteurtre et al . I97I) est réprimée par les sels d'ammonium. Le cas du système des acides dicarboxyliques est plus complexe : suivant les souches, ce système est soumis à régulation par repression ou par inhibition. Cette régulation par repression est particulièrement intéressante : la synthèse de l'un des éléments du système de transport est réprimée par l'acide glutamique (75 % au maximum), l'arginine (65 %) et la lysine (90 %). Il s'en suit qu'un mutant lysine - précultivé sur lysine, présente d'abord une mauvaise croissance sur acide L α-aminoadipique.

Mais la spécificité du transport ne s'observe qu'en présence d'ions ammonium; en leur absence au contraire l'entrée de chaque aminoacide est sujette à inhibition compétitive

....

de la part des autres aminoacides. En outre, la sensibilité aux analogues perdue par des mutants du type arg-p1 ou lys-p1 est recouvrée quand les ions ammonium du milieu sont remplacés en tant que source d'azote par la proline. Selon Grenson et al . (I970), ces faits peuvent s'expliquer par l'existence, en plus des perméases spécifiques, d'une aminoacide-perméase générale qui catalyse le transport des aminoacides basiques et neutres, mais non celui de la proline et probablement pas celui des aminoacides dicarboxyliques. Une mutation gap est caractérisée par l'absence de cette perméase générale, mais n'est pas allélique à la mutation aap isolée par Surdin et al . (I965) et n'a d'ailleurs pas non plus le même phénotype. Cette perméase générale est constitutive et son activité est inhibée par les ions ammonium. Quand la proline constitue l'unique source d'azote, les perméases spécifiques et la perméase générale sont actives simultanément. Enfin, Grenson et Hennaut (I97I) ont mis en évidence récemment une mutation apf, allélique de la mutation aap de Surdin et al . (I965), affectant à la fois les deux types de perméases et agissant sur un élément commun aux différents systèmes, peut-être sur un mécanisme de couplage énergétique.

Les rôles respectifs des deux systèmes semblent être les suivants : le transport d'un aminoacide particulier par sa perméase particulière est suffisant pour pourvoir aux besoins spécifiques en cet aminoacide lors d'une culture sur sels d'ammonium; en l'absence de ces derniers, l'amplification du transport par la mise en jeu de l'aminoacide perméase générale permet aux aminoacides de jouer le rôle de source d'azote suivant un ordre qui dépend du Km de la perméase à leur égard et de leur concentration dans le milieu.

Il n'est pas exclu que les diamines et polyamines interfèrent avec cette entrée des aminoacides, comme cela a été observé chez E. coli : l'entrée d'un aminoacide basique est

...

inhibée par la diamine correspondante (Mandelstam, I956); toutefois Tabor et Tabor (I966) estiment que ces compétitions ne sont pas d'une grande importance. Chez S. cerevisiae, Grenson (I967) n'a pas observé d'effet des diamines sur l'entrée de l'arginine.

Les compétitions entre acides aminés ou entre polyamines et acides aminés peuvent engendrer des inhibitions de croissance chez les auxotrophes : chez Neurospora, la croissance d'un mutant arg- est inhibée par la présence de lysine (Cybis et Weglenski I969); chez E. coli, la croissance d'une souche lys- est inhibée par la présence de cadavérine (Mandelstam I956).

La distribution intracellulaire des aminoacides chez les levures est mal connue, mais son hétérogénéïté est fréquemment invoquée pour expliquer qu'un aminoacide n'exerce pas d'effet inhibiteur, alors que sa concentration intracellulaire globale semblerait devoir lui en faire exercer un sur un enzyme qui s'y est révèlé sensible in vitro. C'est ainsi que de Robichon-Szulmajster (I967) explique le fait que l'aspartokinase est in vitro complètement inhibée par la thréonine 5 mM, alors qu'in vivo une concentration externe I0 mM qui peut porter la concentration interne globale à 200 mM n'exerce qu'une inhibition de 50 %; ces faits s'expliqueraient par l'existence de pools individualisés séparant les acides aminés transportés par les perméases, du site de formation et d'activité des enzymes et, même quoiqu'à un degré moindre, du site de formation des répresseurs. La mise en évidence antérieure chez Candida utilis de l'existence d'un pool expansible ("expandable pool") dans lequel se concentrent les aminoacides exogènes et d'un pool interne ("internal pool" seul présent en l'absence d'aminoacides exogènes, fournit d'ailleurs une base à ces explications (Cowie et Walton,I956 ; Cowie et Mc Clure I959); le pool interne est en relation plus étroite avec la biosynthèse protéïque que le pool externe;

....

toutefois Halvorson et Cohen (I958) ont montré que chez S. cerevisiae la phénylalanine exogène peut être incorporée dans les protéines sans passer par le pool interne, ce qui amène à penser que la biosynthèse s'effectue à partir d'un autre pool dans lequel confluent les deux précédents.

I.2. LA LYSINE.

I.2.I - La biosynthèse et sa régulation.

Elle fait apparaître immédiatement une différence importante entre les bactéries et les levures.

Chez Escherichia coli, les premières étapes des biosynthèses de la lysine, de la thréonine et de la méthionine sont communes, la première bifurcation se situant après l'aspartyl-semi aldéhyde; il en résulte que la lysine assure non seulement la régulation de sa propre chaîne mais concourt aussi à la régulation concertée des étapes communes et exerce en particulier une action de répression sur la synthèse et d'inhibition sur l'activité de l'une des deux aspartokinases (Stadtman et al . I96I).

L'examen de la suite de la biosynthèse montre que la molécule de la lysine est en réalité d'origine complexe : aspartate et glutamate concourent à sa formation; le diamino-pimélate est un intermédiaire.

Chez S. cerevisiae, la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine part toujours de l'acide aspartique, mais en revanche celle de la lysine s'effectue directement à partir du glutamate, via l'α-cétoadipate, l' α-aminoadipate, l'α-aminoadipyl-δ-semialdéhyde et la saccharopine (fig.1)

....

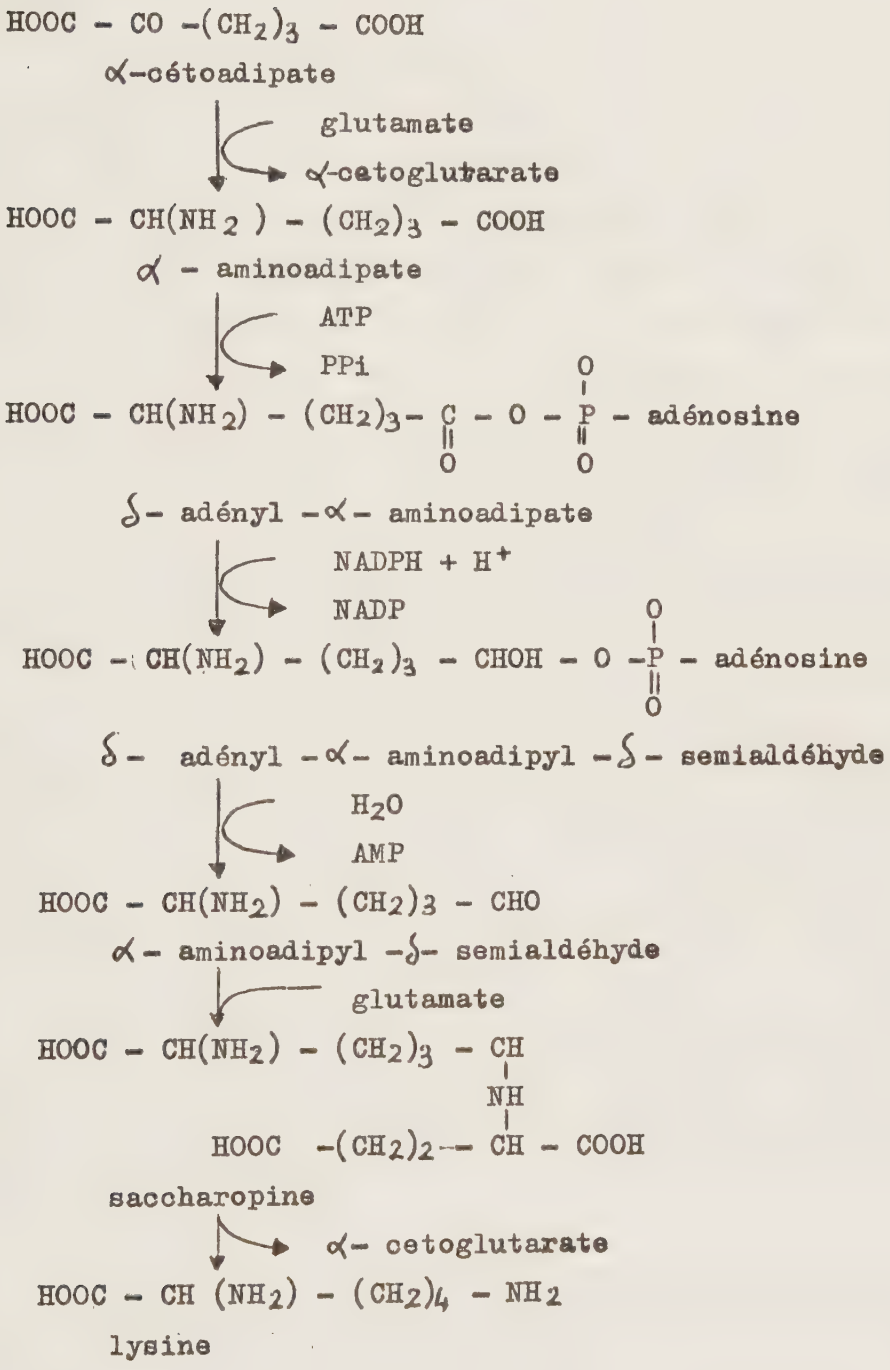


Fig.1. Fin de la biosynthèse de la lysine. (références dans le texte).

Dans ce schéma, plusieurs points n'ont été précisés que récemment, en particulier en ce qui concerne les dernières réactions.

On a cru d'abord que le passage de l'aminoadipyl-semialdéhyde à la lysine, de même que le passage du glutamyl-semialdéhyde à l'ornithine se faisait par une transamination catalysée par l'ornithine transaminase : Scher et Vogel (I957) avaient en effet constaté que la présence d'ornithine transaminase est exclusive de la voie du diamino-pimélate. La suite a révèlé des faits beaucoup plus complexes. L'ornithine transaminase, chez S. cerevisiae tout au moins, n'agit que dans le métabolisme de l'ornithine et seulement dans le sens ornithine ⟶ glutamyl-γ-semialdéhyde.

Quant au passage α-aminoadipyl-δ-semialdéhyde ⟶ lysine, il s'effectue par une transamination très particulière : à la faveur d'une réduction catalysée par la saccharopine réductase, il y a d'abord condensation du groupement aminé du glutamate et du groupement aldéhyde de l'α-aminoadipyl-δ-semialdéhyde, ce qui donne la saccharopine; la saccharopine deshydrogénase catalyse ensuite la séparation de l'α-cétoglutarate et de la lysine (Trupin et Broquist I965, Jones et Broquist I965).

Plus récemment encore, il a été démontré que la réduction de l'α-aminoadipate en α-aminoadipyl-δ-semialdéhyde s'effectuait par l'intermédiaire de composés activés par l'ATP (Sinha et Bhattacharjee I970; Fjellstedt et Ogur I970; Sinha et Bhattacharjee I97I).

La régulation du système est encore imparfaitement connue. La lysine exerce une rétroaction sur certaines étapes précoces, en particulier elle inhibe la formation de l'homocitrate (Maragoudakis et al . I967), en agissant de façon coordonnée sur les trois premiers enzymes dont les gènes ne sont cependant pas liés (Bhattacharjee I970).

....

La fin de la biosynthèse ne semble pas soumise à une régulation serrée : la présence de lysine, même à concentration élevée, ne réprime pas sa synthèse à partir de l'α-cétoadipate ou de l'α-aminoadipate (Broquist et al . I96I, Jones et Broquist I965). Toutefois, Sinha et al . (I97I) ont récemment mis en évidence un effet inhibiteur notable de la lysine et l'hydroxylysine sur la saccharopine réductase. Rappelons,d'autre part, l'effet de répression qu'elle exerce sur la synthèse du système de transport de cet acide aminé (voir ci-dessus).

Malgré ce schéma qui rend la biosynthèse de la lysine totalement indépendante de celles de la méthionine et de la thréonine, il est remarquable que la lysine ait conservé une action régulatrice sur l'aspartokinase; cette action est difficile à interprèter; de Robichon-Szulmajster (I967) avance l'hypothèse de la conservation d'un vieux mécanisme au cours de l'évolution; il est vraisemblable que s'il en est ainsi, c'est que ce mécanisme a gardé un rôle important qui n'est sans doute pas le rôle ancestral, mais pourrait être un rôle de coordination entre les biosynthèses de différents aminoacides. D'ailleurs, si au cours de l'évolution une chaîne métabolique ramifiée donne naissance à deux voies métaboliques distinctes, cela se traduirait par une baisse du niveau d'intégration de l'ensemble, donc par un inconvénient sélectif, si parallèlement le système régulateur de la chaîne ramifiée ne se transformait en un système d'interrégulation des deux chaînes.

I.2.2.- Etude comparée de la faculté d'assimiler la lysine.

Thorne a montré en I94I que, pour la levure haute de brasserie, la lysine était sans valeur en tant que source d'azote unique sur milieu synthétique. La lysine est pourtant l'un des premiers aminoacides absorbés lors d'une fermentation sur milieu complexe (Barton-Wright I949).

....

L'étude comparée de la faculté d'utiliser la lysine en tant que source d'azote unique par différentes espèces de levures a été ensuite effectuée par Schultz et Pomper (I948), puis par Walters et Thiselton (I953); ils montrèrent que la découverte de Thorne est généralisable à toutes les levures de brasserie et à certaines autres espèces, mais non à toutes les levures, ni même à tous les Saccharomyces, sans que la distinction entre levures vivant sur lysine et levures ne vivant pas sur lysine recouvre une division systématique connue.

Ces recherches ont été poursuivies par différents chercheurs. En premier lieu, certains ont étudié la possibilité d'utiliser cette particularité pour rechercher les infections dans les levains et leurs travaux ont abouti à la mise au point d'un test universellement employé en brasserie (Morris et Eddy I957, Brady I958).

D'autres ont confirmé ces faits en étudiant systématiquement l'assimilation de différents acides aminés par les levures dans le but de préciser le comportement de la levure en fermentation (Ribereau-Gayon et Peynaud I966).

D'autres enfin ont élargi le champ de l'étude de manière à utiliser l'aptitude à assimiler la lysine et d'autres acides aminés ou amines à titre de source d'azote unique ou de source de carbone unique, comme critère taxonomique (Abadie I967, Hedrick et Dupont I968, Abadie I968, Larue et Spencer I968).

Ces travaux confirment l'absence de relation entre l'aptitude à utiliser ces composés et la position systématique. Larue et Spencer (I968) ont cependant mis en évidence le fait intéressant que la plupart des levures aptes à croître sur la L-lysine ou sur les amines sont également capables d'utiliser les D-aminoacides.

....

I.2.3. La dégradation et sa régulation.(fig. 2)

Elle ne semble pas avoir été étudiée chez S.cerevisiae; plus exactement la bibliographie n'offre pas d'explication de l'incapacité de la levure à utiliser la L-lysine comme source d'azote unique. Il est vraisemblable que la lysine absorbée sur milieu complexe est incorporée directement dans les protéines, mais n'est pas dégradée, du moins pas jusqu'à un composé susceptible de servir de source d'azote.

En revanche, la dégradation est assez bien connue chez les animaux et chez certains végétaux et microorganismes, en particulier chez Neurospora. La dégradation ne s'effectue pas par la même voie que la biosynthèse, mais d'une façon assez générale sans doute, par la voie conduisant au pipecolate en passant par l'ε-amino-α-cetocaproate et le Δ_1-piperideine-2 carboxylate (Schweet et al . I954, Meister et al . I957, Gupta et Spenser I969).

Le pipecolate serait ensuite transformé en α-aminoadipate par l'intermédiaire du Δ_1-piperidine -6- carboxylate et de l'α-aminoadipyl -δ- semialdéhyde, mais seule la partie de la dégradation conduisant au pipecolate a été effectivement mise en évidence chez Neurospora (Yura et Vogel I959, Linstedt et al . I967). La suite ne pose pas de problème, l'α-aminoadipate étant susceptible de subir une transamination. Cette dégradation est donc une source possible du noyau pipéridine et de l'azote.

Chez S. cerevisiae, l'α-aminoadipate est susceptible de servir de source d'azote unique (Hwang et al . I966), c'est donc entre la lysine et ce produit que se situe la déficience enzymatique rendant la dégradation impossible, si toutefois la voie normale de dégradation chez les levures passe bien par le pipecolate et l'α-aminoadipate; mais il existe d'autres possibilités :

- chez Hansenula Saturnus, la dégradation se déroule, selon Rothstein (I965) par une voie des composés acétylés.

...

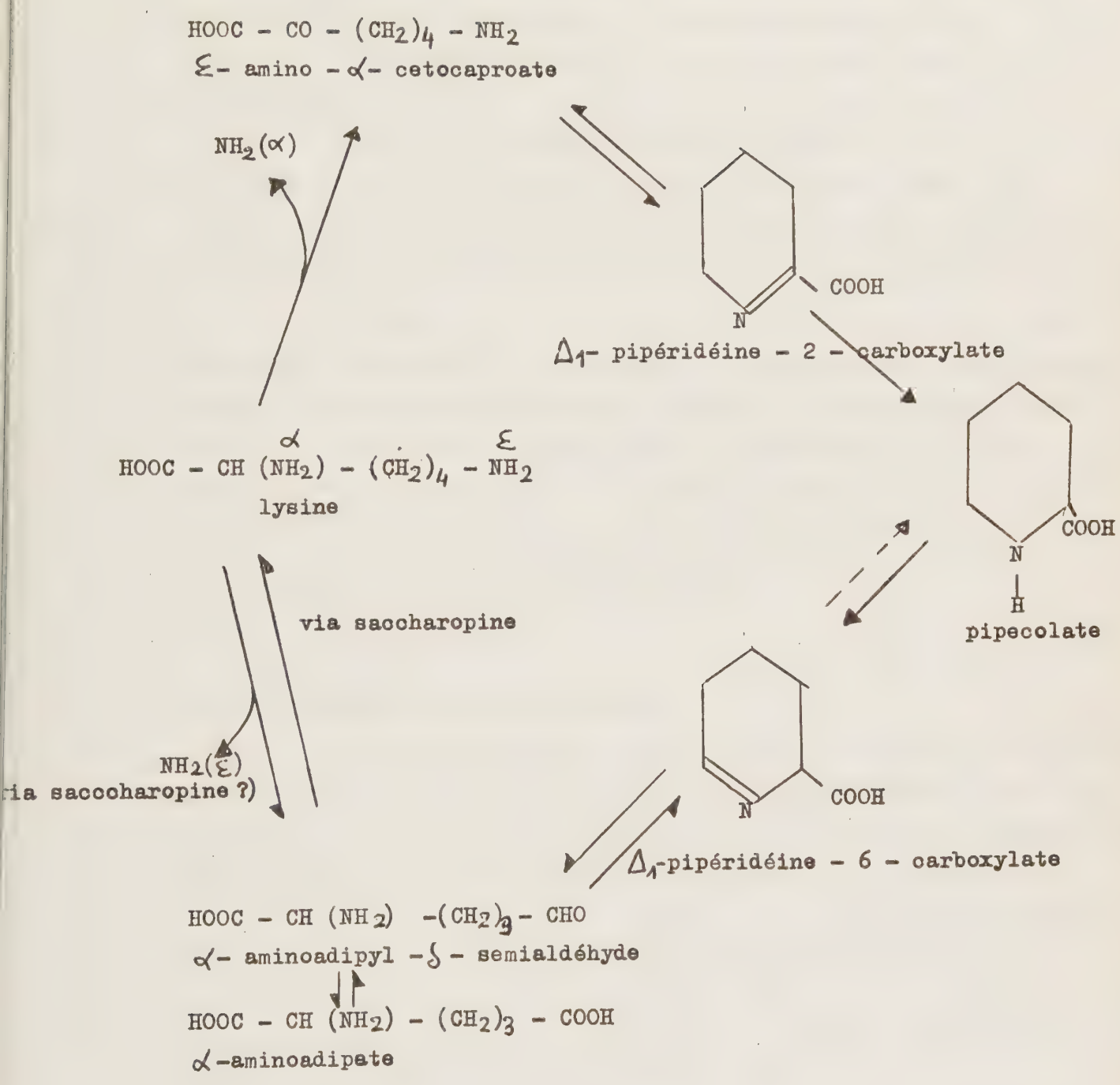


Fig.2. Début de la dégradation de la L-lysine chez Neurospora (Gupta et Spenser 1969).

- chez les Mammifères, l'importance de la voie du pipecolate n'est pas admise par tous (Boulanger et al . I969) et il est même possible que la voie principale passe par la saccharopine.

- chez Clostridium Sticklandii enfin, a été mis en évidence et étudié un mode de dégradation anaérobie, représentant une véritable fermentation de la L-lysine (Stadman et Renz I968 et nombreux travaux cités par ces auteurs).

La régulation de certaines au moins de ces dégradations fait intervenir le phénomène de répression catabolique: c'est ainsi que Grady (I969) a montré, en travaillant d'ailleurs sur une flore complexe, que la présence de glucose empêche la dégradation de la lysine et son utilisation comme source d'azote, alors que la croissance est possible sur un milieu contenant des ions ammonium comme source d'azote et de la lysine comme source de carbone.

I.2.4. Les effets métaboliques-

En dehors des effets dans le métabolisme de la méthionine et de la thréonine au niveau de l'aspartokinase (cf. ci-dessus), l'intervention de la lysine a été mise en évidence dans un autre métabolisme au moins, celui de l'arginine.

Dès I936, Elbacher et Zeller, suivis par Hunter and Downs en I945, ont mis en évidence une action inhibitrice compétitive de l'ornithine et de la lysine sur l'arginase (organisme non précisé); l'effet de la lysine semble s'expliquer par son analogie avec l'ornithine.

Chez S. cerevisiae, Ramos et al . (I970) ont montré que la lysine mime l'ornithine; elle exerce une répression notable (50 %) sur l'ornithine transcarbamylase entraînant une baisse de pool de l'arginine.

....

Aussi bien dans le cas de l'aspartokinase, que dans le cas de l'ornithine transcarbamylase, il s'agit d'actions régulatrices sur des métabolismes sans rapport avec celui de la lysine. Dans le premier cas, cela peut s'expliquer par la survivance d'un mécanisme ancestral (voir ci-dessus) et dans le second cas par une analogie chimique entre la lysine et une molécule normalement régulatrice, l'ornithine. Il n'en reste pas moins que, si d'autres exemples d'interventions de ce type sont découverts, il sera possible d'envisager que l'évolution a exploité certains faits phylogénétiques ou chimiques pour créer un type de régulation d'ordre supérieur, du type "metabolic interlock" (Kane et Jensen I970, Rebello et Jensen I970).

I.3. L'ARGININE ET L'ORNITHINE.

Les voies métaboliques et leur régulation sont représentées sur la figure 3.

I.3.I. La biosynthèse et sa régulation.

Les grandes étapes de l'élucidation de cette biosynthèse ainsi que les particularités de celle-ci chez les levures ont été analysées récemment dans deux thèses (Thuriaux I969, Thouvenot I97I) et dans deux articles de synthèse (Umbarger I969, de Robichon-Szulmajster et Surdin-Kerjan I97I).

Nous reviendrons seulement sur la biosynthèse de l'ornithine. Le fait que certains mutants de Neurospora et de Penicillium répondent à la fois à la proline, l'ornithine, la citrulline et l'arginine, mais non à l'acide glutamique suggéra l'existence en aval de glutamate d'un intermédiaire commun aux biosynthèses de l'ornithine et de la proline (Srb, Fincham et Bonner I950); or, le glutamyl - γ - semialdéhyde qui permet également la croissance de ce type de mutants (Vogel I953) est un précurseur de la proline (Vogel et Bonner I954) et semblait également pouvoir être un précurseur de

...

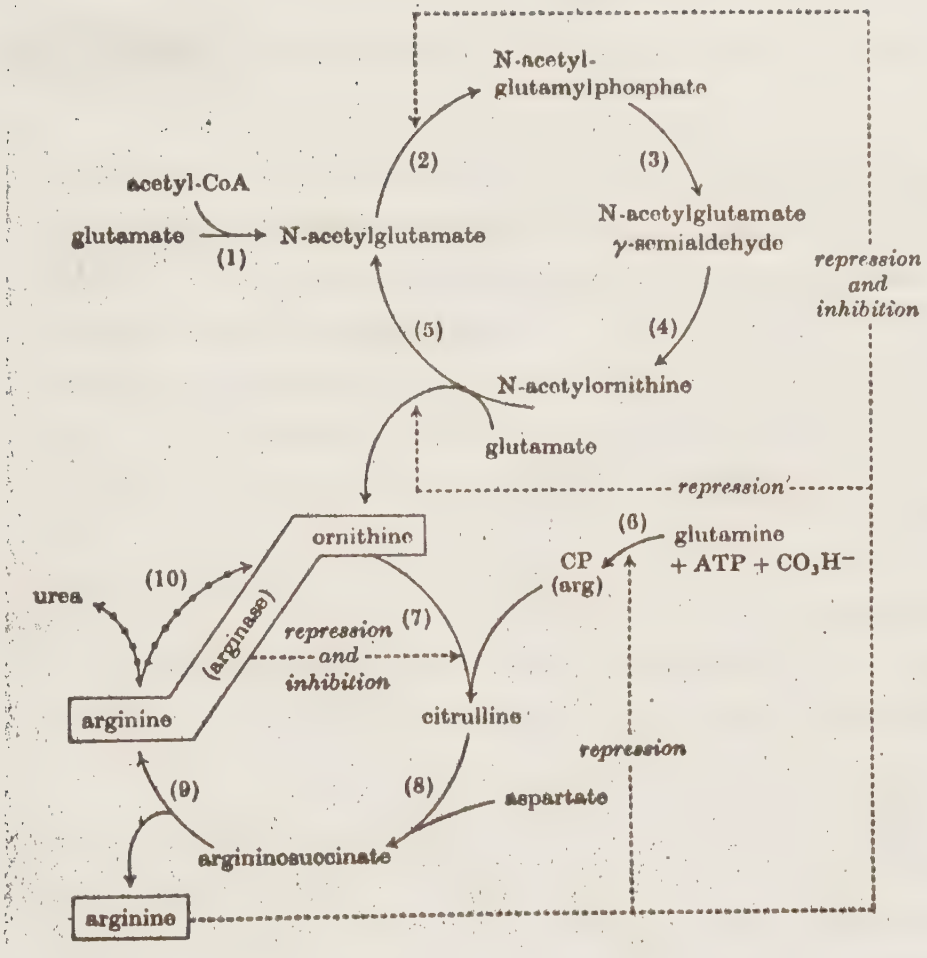


Fig.3. Biosynthèse de l'arginine chez S. cerevisiae et sa régulation (de Robichon-Szulmajster et Surdin-Kerjan 1971).

l'ornithine, l'ensemble bénéficiant d'un "channelling" ; Scher et Vogel (I957) suggérèrent que l'ornithine-transaminase pouvait catalyser les deux réactions analogues :

glutamyl - γ - semialdéhyde ⟶ ornithine

et α-aminoadipyl-δ-semialdéhyde ⟶ lysine.

Il s'est avéré ensuite que ces deux transformations étaient en fait beaucoup plus complexes. La voie des composés acétylés, d'abord découverte chez Micrococcus glutamicus (Udaka et Kinoshita I958), fut mise en évidence chez S. cerevisiae par De Deken (I962, I963). Cette acétylation, en bloquant le groupement NH_2, empêche la cyclisation qui aiguillerait le glutamate sur la voie de la proline; selon Thuriaux (I969), cette acétylation joue le même rôle qu'une compartimentation; elle assure donc le "channeling" postulé par Vogel et Bonner. De Deken montra ensuite que chez S. cerevisiae, comme chez Micrococcus glutamicus, le groupement acétyle n'est pas comme chez E. coli libéré par une acétylornithinase, mais recyclé sur le glutamate par une transacétylase.

La réduction de l'acide N-acétylglutamique en N-acétylglutamyl-semialdéhyde, s'effectue chez Micrococcus glutamicus (Udaka et Kinoshita, I958) en deux étapes et met en jeu une activation par l'ATP. Selon Thuriaux (I969), le schéma est analogue chez S. cerevisiae; cependant, si la kinase avait été mise en évidence directement chez Micrococcus glutamicus, chez S. cerevisiae son intervention n'était affirmée que par la nécessité d'ATP pour réaliser la réaction globale :

N-acétylglutamate ⟶ N-acétylglutamyl-semialdéhyde (De Deken I962). Cette mise en évidence a été réalisée récemment par Minet (I97I).

La régulation de cette voie anabolique a été bien étudiée. Une répression par l'arginine a été mise en évidence

....

sur la synthèse des enzymes suivants :

N-acétylglutamate ⟶ N-acétylglutamyl-semialdéhyde
(N-acétylglutamate réductase; De Deken I962)

N-acétylornithine + glutamate ⇄ N-acétylglutamate + ornithine
(transacétylase; De Deken I963).

glutamine ⟶ carbamylphosphate
(L-glutaminocarbamoylphosphate synthetase : CPsase; Lacroute et al . I965).

ornithine ⟶ citrulline
(L-ornithinecarbamoyl transferase : OTCase; Bechet et al . I962)

citrulline ⟶ argininosuccinate
(L-citrulline L-aspartate ligase : ASsase; Thuriaux I969).

L'ornithine, ainsi d'ailleurs que la lysine, exerce également un effet répresseur sur la synthèse de l'OTCase, bien que le taux d'arginine intracellulaire soit très faible en leur présence; en revanche, la citrulline exerce un effet dérépresseur antagoniste de celui de l'arginine au niveau de l'ASsase et même au niveau de l'OTCase (Thuriaux I969, Ramos et al . I970). Les mutations récessives argR font disparaître la répressibilité de l'OTCase et de l'ASsase, mais non celle de la CPsase; une autre mutation cpao rendant cette CPase constitutive a été isolée, mais il s'agit cette fois d'une mutation dominante.

La régulation de l'activité de ces enzymes a également été étudiée. De Deken (I963) a montré que le passage du N-acétylglutamate au N-acétylglutamyl-semialdéhyde, est inhibé par l'arginine, mais n'a observé d'inhibition ni en

....

présence d'ornithine, ni en présence de lysine. Il semble d'ailleurs général que dans les organismes chez lesquels le groupe acétyle est transféré sur le glutamate, la rétro-action ne s'exerce pas sur la première réaction qui a perdu de son importance mais sur la seconde (Udaka et Kinoshita I958; Farago et Denes I967).

D'autre part, Bechet et Wiame (I965) ont montré que l'OTCase est soumise à une inhibition stoechiométrique de la part d'une apoprotéine de régulation qui a ensuite été identifiée à l'arginase (Messenguy et Wiame I969); cet effet de l'arginase sur l'OTCase offre un exemple intéressant d'interaction entre anabolisme et catabolisme (voir ci-dessous).

I.3.2. Le catabolisme et sa régulation.

La dégradation de l'arginine chez S. cerevisiae met en jeu successivement l'arginase et l'ornithine transaminase (Bechet et Wiame I964, Middelhoven I964); le Δ1-pyrroline-5-carboxylate produit peut ensuite être converti en glutamate, ou en proline.

Les deux premières réactions ont fait l'objet d'études particulièrement intéressantes. Middelhoven (I964) a montré que l'arginase et l'ornithine-transaminase sont induites par l'arginine et de façon moins efficace par l'ornithine; cette induction directe de l'ornithine-transaminase par l'arginine, indique que la fonction essentielle de l'ornithine-transaminase réside dans la dégradation de l'arginine et non dans la biosynthèse d'ornithine et de lysine, comme le pensaient Scher et Vogel (I957). Ces deux enzymes sont, d'autre part, réprimés par les ions NH_4^+ et par un certain nombre d'aminoacides; leur dérepression brutale s'observe lors du transfert sur un milieu dépourvu de source d'azote et aussi lors d'une culture sur sels d'ammonium, en fin de phase exponentielle (Middelhoven I968 , I970). Selon cet auteur, la dérepression observée à la

....

suite d'une telle privation azotée est analogue, tant par sa rapidité que par son amplitude, à celle observée lors du transfert sur un milieu contenant de l'arginine comme seule source d'azote. La synthèse de ces deux enzymes serait donc réglée par deux phénomènes antagonistes, l'induction par l'arginine et la répression par certains composés azotés (Middelhoven I970, Chan et Cossins I972). Mais selon Wiame (I97I), il ne s'agit pas de l'antagonisme de deux types d'effecteurs agissant sur un même système de régulation, mais d'un double contrôle : induction par arginine et ornithine contrôlée par les gènes arg R d'une part, répression catabolique azotée d'autre part; c'est ainsi que les mutants arg R⁻ qui ont perdu à la fois la répressibilité de l'OTCase et l'inductibilité de l'arginase et l'ornithine transaminase (voir ci-dessous), manifestent cependant une élévation d'activité de ces derniers enzymes lorsqu'on les cultive en chémostat à NH_4^+ limitant.

Le troisième enzyme de la voie métabolique, la proline deshydrogénase n'est pas, selon Thuriaux (I969) significativement inductible par l'arginine.

Les données relatives à la régulation de l'activité de ces enzymes cataboliques sont rares chez les levures. Il est connu depuis longtemps que, chez certains organismes, l'arginase est soumise à inhibition compétitive de la part de l'ornithine et de la lysine (Hunter et Downs I945). Middelhoven (I969) a montré que l'ornithine avait également cet effet chez S. cerevisiae.

I.3.3. Relations entre l'anabolisme et le catabolisme.

Cette question a fait l'objet d'une synthèse récente de Wiame (I97I).

L'exclusion réciproque de deux voies métaboliques opposées peut en principe être obtenue par des mécanismes classiques d'inhibition d'activité ou de répression de synthèse

....

s'exerçant indépendamment sur chacune des deux voies. Mais d'autres mécanismes interviennent chez S. cerevisiae en ce qui concerne, d'une part, la régulation de l'activité et, d'autre part, la synthèse des enzymes.

La découverte d'un effet inhibiteur de l'arginase sur l'OTCase est une première indication d'une interaction entre les deux voies inverses (Messenguy et Wiame, I969); cet effet ne se manifeste qu'en présence d'arginine et d'ornithine; il met en jeu une fixation stoechiométrique de l'arginase sur l'OTCase en un site différent du site catalytique; l'ornithine seule, à la concentration 5 mM exerce aussi sur l'OTCase une action négative, une inhibition par excès de substrat; la désensibilisation chimique, thermique ou génétique à l'égar de l'ornithine est corrélative d'une désensibilisation à l'égard de l'arginase (Messenguy et al . I97I).

D'autre part, en ce qui concerne la biosynthèse des enzymes, l'analyse du phénotype des mutants de régulation arg R (Thuriaux et al . I968) a fait apparaître qu'en plus du caractère constitutif des enzymes anaboliques, la plupart de ces mutants manifestent une capacité réduite quant à l'induction des enzymes cataboliques. Ce fait a conduit les auteurs précédents et Wiame (I97I) à l'hypothèse selon laquell les gènes arg R contribueraient à la synthèse d'un aporepresseur hétéropolypeptidique, qui exercerait d'une part un contrôle négatif classique sur la synthèse de l'OTCase et, d'autre part, sur la synthèse de l'arginase et de l'ornithine transaminase; un contrôle positif résultant de la succession de deux contrôles négatifs (inhibition d'une inhibition).

Toutefois, ce gène arg R n'est que partiellement responsable de la régulation de la synthèse de l'arginase et l'ornithine transminase, qui sont d'autre part, nous l'avons vu, soumis à une répression catabolique (Wiame, I97I).

....

I.4. LES DIAMINES ET POLYAMINES.-

Cette famille de substances chimiques, dont la présence dans les cellules vivantes est connue depuis longtemps, suscite un intérêt croissant depuis qu'on lui a découvert une influence sur la stabilité des acides nucléïques, ainsi que divers effets biologiques. L'implication de ces substances dans le phénomène que nous avons étudié s'explique par le fait que le métabolisme des diamines et polyamines est branché sur le métabolisme de l'ornithine et de l'arginine.

I.4.I. Généralités.-

Les diamines et polyamines ont fait l'objet de plusieurs revues parmi lesquelles nous citerons celles de Tabor et al . (I96I), de Tabor et Tabor (I964), de Bachrach (I970), de Smith (I972); l'intérêt actuel de ces substances est, d'autre part, attesté par la tenue récente d'un colloque de l'Académie des Sciences de New-York, centré sur leur métabolisme et leur fonction biologique. De tout le matériel disponible, seul sera retenu ce qui est directement en rapport avec notre travail.

Les diamines et polyamines les plus répandues dans la nature sont :

- le I,3-diaminopropane : $NH_2\ (CH_2)_3\ NH_2$
- le I,4-diaminobutane (putrescine): $NH_2\ (CH_2)_4\ NH_2$
- le I,5-diaminopentane (cadavérine): $NH_2\ (CH_2)_5\ NH_2$
- le 3,3-diaminodipropylamine: $NH_2(CH_3)_3\ NH(CH_3)_3\ NH_2$
- la spermidine : $NH_2\ (CH_2)_3\ NH\ (CH_2)_4\ NH_2$
- la spermine : $NH_2\ (CH_2)_3\ NH\ (CH_2)_4\ NH\ (CH_2)_3\ NH_2$

Récemment, ont été découvertes, la sym-homospermidine, $NH_2\ (CH_2)_4\ NH\ (CH_2)_4\ NH_2$, dans les feuilles de Santaleum album (Kuttan et all. I97I), et le N-3 aminopropyl-I,5-diaminopentane, $NH_2\ (CH_2)_3\ NH\ (CH_2)_5\ NH_2$, chez E. coli (Dion et Cohen, I972).

....

Celles auxquelles sont attribués les effets les plus marquants sont la putrescine, la spermidine et la spermine. Ces trois substances ont été décelées chez les levures, ainsi d'ailleurs que le diaminopropane (Fischer et Bohn,I957; Herbst et al . I958; Tabor et al . I958; Weaver et Herbst I958)

Les concentrations présentes sont de l'ordre de 5 à I0 mM dans les cellules des organismes gram-, nettement moins dans celles des organismes gram+ (Herbst et al . I958); les concentrations sont élevées par la présence de lysine ou d'arginine dans le milieu (Möller I955). La localisation intracellulaire de ces substances est difficile à étudier à cause de la redistribution qui s'effectue après la disruption cellulaire, par suite de la grande affinité de ces polycations pour diverses substances acides. Cependant, il a été établi que I2 à I5 % en sont localisés dans les ribosomes (Cohen et Lichtenstein, I960); d'autre part, les polyamines forment des complexes avec les acides nucléïques et elles se trouvent en partie sous cette forme dans les cellules (Cohen, I970).

L'accumulation des polyamines dans les cellules d'E. coli s'effectue par deux mécanismes : une adsorption sans dépense énergétique, et une absorption active nécessitant une dépense d'énergie; le pH optimal d'entrée se situe vers 7 pour la putrescine qui pénètre rapidement, vers 8 pour la spermidine et la spermine qui entrent plus lentement; le système assurant l'entrée active semble être analogue à ceux mis en jeu pour les aminoacides et les sucres. Les compétitions entre aminoacides et polyamines ne semblent pas jouer un rôle très important (Tabor et Tabor I966).

I.4.2. La biosynthèse et sa régulation.

La figure 4 résume les connaissances actuelles à ce sujet.

....

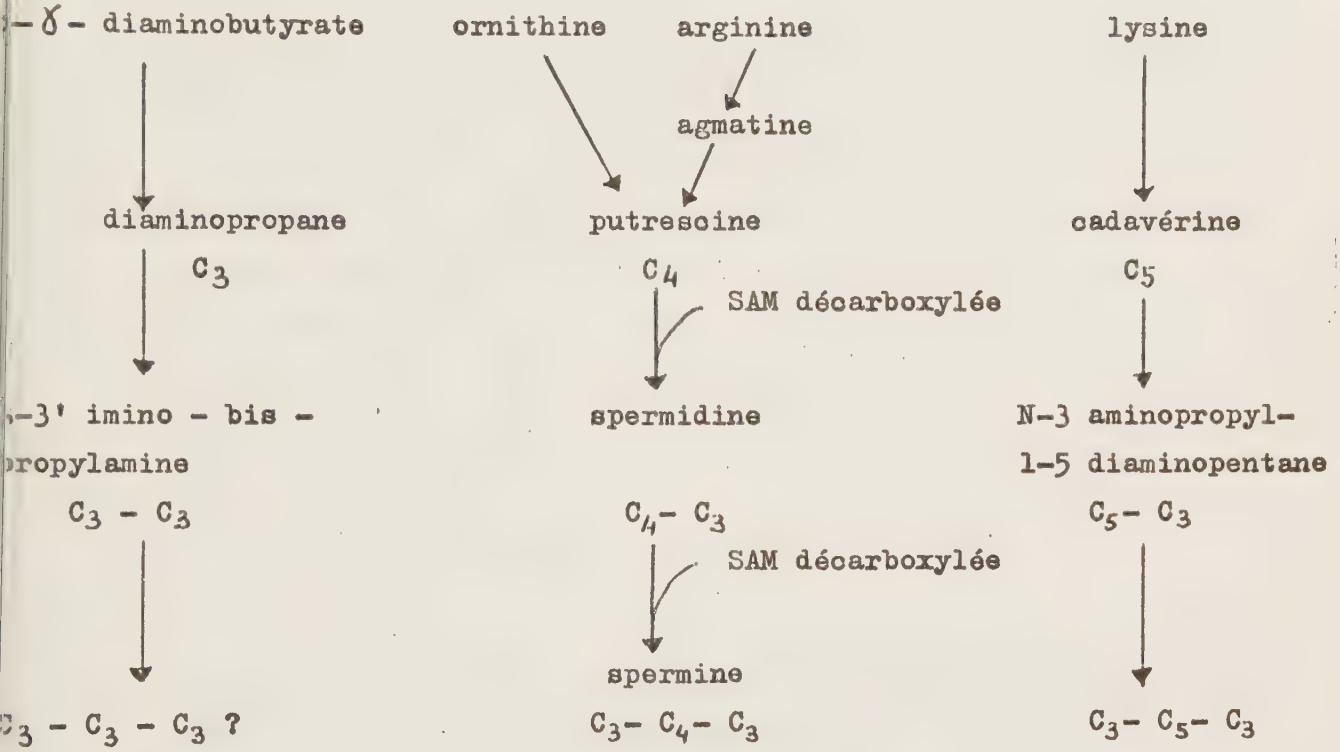


Fig.4. Biosynthèse des polyamines.

Code adopté : $H_2N - (CH_2)_3 - NH_2 - (CH_2)_4 - NH_2(CH_2)_3 - NH_2$ = $C_3 - C_4 - C_3$

SAM = S - adénosylméthionine.

Seule la biosynthèse de la série dérivée de l'ornithine et de l'arginine a été bien étudiée.

Il a été démontré chez E. coli et A. nidulans que la putrescine résulte de la décarboxylation de l'ornithine (Tabor et al . I956, I958), et ce mécanisme semble général; cependant, chez E. coli elle peut également se former à partir de l'arginine via l'agmatine (Morris et Pardee I966), ce qui est à rapprocher de l'incapacité de cet organisme à passer de l'arginine à l'ornithine (Morris et Jorstad, I970). Tabor et Tabor (I969) ont d'ailleurs mis en évidence une séparation fonctionnelle de deux pools d'arginine, un pool endogène et un pool exogène, le second étant utilisé préférentiellement lors de la synthèse de putrescine; il en résulte que les deux voies ne fonctionnent pas indifféremment, la voie de l'ornithine fonctionnant sur milieu minimum et la voie de l'arginine sur milieu supplémenté en cet acide aminé (Morris et Koffron, I969).

Chez E. coli, la spermidine est ensuite synthétisée par condensation de la putrescine avec le produit de décarboxylation de la S-adénosylméthionine (Tabor et al . I958), et la spermine par condensation de la spermidine avec le même produit; les mêmes enzymes semblent en cause dans les deux cas, à savoir la S-adénosylméthionine décarboxylase et la spermidine synthase (Jänne et al ., I97I a). Ces enzymes ont également été mis en évidence chez S; cerevisiae (Jänne et al ., I97I b).

La régulation de cette biosynthèse est complexe et s'exerce d'une part, sur le métabolisme de l'arginine en amont de l'ornithine et, d'autre part, sur la partie de la voie située après le branchement; des facteurs complexes liés à l'état physiologique de l'organisme concourent à cette régulation par des voies mal connues.

Davis et al . (I970) ont constaté chez des mutants de Neurospora crassa déficients en arginase, que l'arginine inhibe leur croissance et que la spermidine, la putrescine et l'ornithine lèvent cette inhibition; Morgan (I970) a d'ailleurs montré ensuite que la proline la lève également;

.....

Davis et al . attribuent l'effet négatif sur la croissance à une carence en putrescine et spermidine résultant elle-même d'une carence en ornithine provoquée, d'une part, par la déficience arginasique et, d'autre part, par la rétroaction qu'exerce l'arginine sur la synthèse de l'ornithine; ce phénomène montre que N. crassa est incapable de synthétiser la putrescine à partir de l'arginine.

Mais l'essentiel de la régulation semble se situer au niveau des décarboxylases. Une arginine et une ornithine décarboxylases inductibles avaient été signalées dès I940 par Gale, mais Morris et Pardee (I966) ont montré la présence de tels enzymes, qu'ils ont qualifiés de biosynthétiques, même en culture sur milieu minimum.

L'existence d'une régulation du niveau de ces enzymes a été démontrée récemment chez E. coli. Dans une souche sauvage, dans les conditions habituelles, aucune repression ne s'observe en présence de putrescine ou de spermidine, mais en revanche si le niveau de putrescine est préalablement abaissé par une culture en chémostat à arginine limitante, les niveaux d'arginine et d'ornithine décarboxylases, déréprimés dans ces conditions, peuvent ensuite être reprimés par addition de putrescine (Tabor et Tabor, I969).

Les deux décarboxylases d'E. coli sont d'autre part soumises à une inhibition par des concentrations physiologiques de putrescine et de spermidine (Morris et al . I970). La possibilité pour ces enzymes de jouer un rôle régulateur important est accrue par leur durée de vie exceptionnellement courte (Snyder et al . I970). Chez les organismes pluricellulaires, l'induction de l'ornithine-décarboxylase s'observe à l'origine de changements physiologiques caractérisés par un regain d'activité de division cellulaire. Il en sera question lors de l'étude des effets biologiques des polyamines.

....

I.4.3. Effets biologiques.-

L'importance biologique de ces produits est attestée par l'existence d'auxotrophes; les premiers furent mis en évidence chez A. nidulans par Sneath (I955), et chez Hemophilus parainfluenzae par Herbst et al . (I955). Chez A. nidulans, une souche isolée par Sneath n'atteint son plein développement qu'en présence de putrescine, ou à défaut de spermidine à concentration plus élevée; les autres produits testés sur la souche se sont révèlés inactifs ou même inhibiteurs compétitifs (I-3 propane-diamine, cadavérine, lysine). Chez S. cerevisiae, Weaver et Herbst (I958) ont mis en évidence un effet stimulant de la putrescine, du diaminopropane, mais surtout de la spermidine et de la spermine. Chez N. crassa, Davis et al . (I970) ont montré l'effet d'inhibiteur sur la croissance d'une carence en polyamines résultant d'une déficience en arginase et du blocage de la biosynthèse d'ornithine par la présence d'arginine.

Chez E. coli, l'impossibilité d'isoler des mutants auxotrophes pour les polyamines était interprètée comme un indice de leur faible importance; l'isolement récent de mutants dont la déficience ne se manifeste qu'en présence d'arginine montre que cette impossibilité résultait en fait simplement de l'existence de deux voies de biosynthèse partant respectivement de l'ornithine et de l'arginine : la déficience en arginine-décarboxylase constitutive, ou en arginine-uréohydrolase ne se manifeste en effet que si l'arginine bloque la biosynthèse d'ornithine et par conséquent celle de la putrescine à partir de cette dernière (Morris et Jorstad, I970; H irschfield et al . I970); chez ces mutants, le besoin de putrescine est donc conditionnel.

De tels mutants ont permis de commencer à élucider le rôle biologique des polyamines. Maas et al . (I970) ont montré que chez E. coli la déficience en polyamines entraîne une croissance morphologiquement anormale; les cellules

....

s'allongent sans se diviser; lors de l'addition ultérieure de putrescine, le nombre de cellules s'accroît plus vite que la masse de matière; ces faits d'ordre morphologique suggèrent que les polyamines ont un rôle dans la division cellulaire.

Inouye et Pardee (I970 a et b) ont montré que le déclenchement de la division cellulaire est en relation avec le taux de putrescine et probablement avec le rapport putrescine/spermidine; chez un mutant arg- privé d'arginine, ce rapport est bas et,lors du retour sur milieu complet, la division ne se produit qu'après restauration du niveau normal qui a lieu simultanément dans toutes les cellules, ce qui synchronise la première division. Or un mutant his- privé d'histidine, présente au retour sur milieu normal un comportement analogue; sa déficience n'est pas en relation directe avec la biosynthèse de la putrescine, comme c'est le cas pour l'arg- ; cependant, selon l'auteur,la privation d'histidine entraînerait par suite de l'arrêt de la synthèse protéïque une accumulation d'arginine qui, sans être suffisante pour produire de la putrescine à la concentration habituelle, pourrait bloquer la synthèse d'ornithine, donc fermer la seconde voie de biosynthèse de cette putrescine. Ces faits ne sont pas parfaitement clairs, mais nous les rapportons parce qu'ils nous ont suggéré des idées relatives à l'explication de l'effet lysine chez S. cerevisiae.

D'autres effets biologiques ont été signalés sans que l'analyse ait été poussée aussi loin. Chez Myxococcus xanthus, l'induction de la formation des microcystes peut être obtenue par la privation de méthionine qui a pour effet de bloquer la biosynthèse de spermidine, ou encore par l'addition de putrescine; sur ce phénomène morphogénétique, on retrouve donc des effets antagonistes de la putrescine et de la spermidine (Witkin et Rosenberg, I970).

....

Chez les animaux, divers phénomènes tels que la régénération du foie, la croissance embryonnaire et tumorale, l'action de certaines hormones et facteurs de croissance, de certaines drogues, font intervenir précocement l'induction de l'ornithine décarboxylase avec pour conséquence l'élévation du taux de putrescine (Raina et al . I965, I966; Russel et Snyder I968; Raina et al . I970; Russel et al . I970; Russel, I970; Stastny et Cohen, I970; Russel I97I; Panko et Kenney I97I; Höltta and Jänne I972) et l'induction de la S-adenosyl-L-méthionine décarboxylase avec pour conséquence l'élévation du taux de spermidine (Russel et Lombardini, I97I)

I.4.4. Effets sur le métabolisme des RNA et des protéines.-

Les effets "in vitro" des polyamines sur les acides nucléïques et sur les enzymes de la biosynthèse des protéines ont fait l'objet d'études importantes sur lesquelles nous passerons rapidement, pour insister sur les effets constatés "in vivo".

Les polyamines exercent sur les acides nucléïques un effet stabilisant analogue par certains côtés à celui des autres cations, mais qui s'en distingue cependant par certains caractères : l'effet stabilisant varie en fonction de la longueur de la molécule de polyamine, la stabilisation optimale étant obtenue pour une longueur déterminée, qui correspond vraisemblablement à l'écartement de deux sites de fixation (voir Mahler et Green I970 et Smith I972).

Les polyamines exercent également une action sur les aminoacyl-synthétases (Doctor et al . I970), sur la RNA polymérase (Gumport I970), sur les t RNA méthylases (Leboy I970). Ces faits observés "in vitro" ont naturellement suggéré un rôle régulateur dans la cellule vivante, d'autant que l'association effective dans la cellule d'une partie des polyamines aux t RNA a été démontrée (Cohen I970).

....

Les données concernant la nature de ce rôle régulateur chez E. coli s'accumulent actuellement, mais leur interprétation par les divers auteurs n'est pas exempte de contradictions.

Les polyamines inhibent la synthèse des protéines et en élèvent le "turn over" aussi bien dans les cellules bactériennes que dans les cellules de mammifères; la synthèse des RNA d'autre part est stimulée à basse concentration, inhibée à haute concentration.

Ces faits ont été établis par un certain nombre d'auteurs (voir Bachrach et Weinstein I970; Brunschede et Bremer I97I). Ce qui n'apparaît pas clairement dans ces travaux, c'est le sens de la relation de cause à effet éventuelle existant entre les variations du niveau des polyamines, de l'activité de synthèse RNA, de l'activité de synthèse protéïque.

Les phénomènes consécutifs à la carence en un aminoacide (souche auxotrophe) vont nous permettre de préciser les diverses possibilités. Le fait de carencer une souche auxotrophe en l'aminoacide indispensable entraîne non seulement un ralentissement de la synthèse des protéines et un accroissement de leur "turn over", mais aussi un arrêt de la synthèse des RNA; cependant une très faible concentration en cet aminoacide suffit pour maintenir la synthèse des RNA; le besoin en aminoacide pour permettre la synthèse RNA est donc plutôt catalytique que stoechiométrique (Gros et Gros I956; Pardee et Prestidge I956).

L'arrêt de la synthèse des RNA affecte les formes stables, t RNA et r RNA, plus que les m RNA (Lazzarini et all. I97I; Pathy et Denes I97I), tandis que la biosynthèse protéïque reste équilibrée (Goodman I970). Les souches "relax" (rel-), au contraire des souches "stringent" (rel+) continuent à synthétiser des RNA lorsqu'elles sont soumises à unecarence en aminoacide (Stent et Brenner I96I); leur biosynthèse protéïque est dans ces conditions très faible et déséquilibrée au profit de certaines protéïnes ribosomales; la dégradation

.....

protéïque est diminuée (Sussman et Gilvarg I969); lors du retour à un milieu complet, ces souches manifestent un temps de latence anormalement long, correspondant à une incapacité prolongée de synthétiser les enzymes inductibles et lié directement à la quantité de RNA accumulée pendant la phase de privation (Javor et al . I969).

Exinger et Lacroute (I97I) ont recherché en vain des mutations affectant la biosynthèse des RNA chez les levures; en revanche, des mutations affectant leur dégradation au cours de la starvation ont été mises en évidence récemment (Lennette et al . I972).

La carence en un aminoacide exerce,d'autrepart, une action à un niveau différent; elle provoque une accumulation des aminoacides en excès qui entraîne une inhibition sur l'entrée (Grenson et al . I968).

Le mécanisme par lequel la carence en un aminoacide agit sur la biosynthèse des RNA n'est pas connu avec certitude, cependant quelques explications intéressantes ont été proposées

Raina et Cohen (I966), Cohen et al . (I967), Raina et al . (I967) ont mis en évidence une relation entre taux de spermidine et biosynthèse RNA, et montré que les souches "relax" produisent plus de spermidine que les "stringent"; le caractère "relax" serait selon eux lié à une élévation du rapport spermidine/putrescine dû à une rétroaction plus intense de la spermidine sur la biosynthèse de la putrescine; c'est cette perturbation qui serait à l'origine de la régulation anormale de la biosynthèse RNA, elle-même responsable du phénotype "relax".

Cette interprétation n'est d'ailleurs pas admise par tous. Selon Ezekiel et Brockman (I968), l'effet des polyamines sur le métabolisme des protéines n'est pas la conséquence, mais la cause de leur effet sur la biosynthèse des RNA : la stimulation du "turn over" protéïque par la spermidine, maintiendrait un pool d'aminoacides insuffisant pour permettre une biosynthèse protéïque notable, mais suffisant pour exercer

....

l'action catalytique (Gros et Gros I956); Pardee et Prestidge I956) nécessaire à la synthèse des RNA.

Les avis divergent donc en ce qui concerne le lien fonctionnel entre biosynthèse protéïque et biosynthèse des RNA : en particulier, il semble mal établi si c'est l'absence d'un acide aminé ou une conséquence quelconque de l'arrêt de la biosynthèse protéïque qui bloque la synthèse des RNA (Boer et al. I97I, Roth et Dampier I972); de toute façon, il paraît raisonnable de penser que les polyamines participent à cette liaison fonctionnelle.

Récemment, à la suite des travaux mettant en évidence un effet des polyamines sur la division cellulaire, Dion et Cohen (I972) ont mis en évidence une action des taux de putrescine et spermidine de la cellule hôte sur la biosynthèse des DNA du bacteriophage T 4.

Si les polyamines ont réellement un tel rôle régulateur sur la biosynthèse des macromolécules, leur niveau doit lui-même être soumis à régulation : par exemple la carence en un aminoacide doit influer sur ce niveau. On n'a actuellement que des idées sommaires sur les voies par lesquelles ce niveau peut être régulé : ce sont leur régulation biosynthétique, fort complexe, dans laquelle l'ornithine décarboxylase joue un rôle prééminent, et leur élimination par excrétion, acétylation ou oxydation (Bachrach I970).

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES.-

2.I. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES ET GENETIQUES.-

L'étude a été effectuée sur la souche haploïde 264-2B de la collection de M. Luzzati et sur des mutants dérivés de cette souche.

2.1.1. Cultures.

2.1.1.1. Milieux liquides -

Les milieux employés qui dérivent du milieu de Wickerham (I95I) pour l'étude des besoins azotés des levures (yeast carbon base), sont de deux types : milieux W peu concentrés pour les études de croissance, milieux F plus concentrés pour préparer le matériel nécessaire aux diverses analyses ou pour certaines études de croissance spéciales (croissance sur L- α -aminoadipate par exemple).

Ces milieux ont été étudiés pour que le rendement de croissance exponentielle et généralement même le rendement de la croissance totale soient limités par la source azotée. Trois séries de milieux ont été utilisées successivement :

- milieux de Wickerham à concentration en $(NH_4)_2\ SO_4$ variable, sans acide folique (milieu W), utilisé seulement pour les premières études de croissance (Bourgeois, I969).

Les autres milieux ne conservent du milieu de Wickerham que la base suivante : par litre

Oligoéléments :

acide borique ($H_3\ BO_3$)	1,00 mg.
sulfate de cuivre ($Cu\ SO_4, 5\ H_2O$)	0,40
iodure de potassium (KI)	1,00
chlorure ferrique ($Fe\ Cl_3, 6\ H_2O$)	2,00
sulfate de manganèse ($Mn\ SO_4, H_2O$)	4,00
molybdate de sodium ($Na_2\ MoO_4, 2\ H_2O$)	2,00
sulfate de zinc ($Zn\ SO_4, 7\ H_2O$)	4,00

....

Vitamines :

biotine	2 µg
pantothénate de calcium	400
acide folique	2
inositol	2 000
niacine	400
acide para-aminobenzoïque	200
chlorhydrate de pyridoxine	400
chlorhydrate de thiamine	400
riboflavine	200

Sels : Sulfate de magnésium ($Mg\ SO_4\ ,\ 7\ H_2O$) 0,50 g
chlorure de sodium (Na Cl) 0,I0 g
chlorure de calcium ($Ca\ Cl_2, 2\ H_2O$) 0,I0 g

- Milieux W1 et F1.

Milieu W1. Par litre : base de Wickerham ; $H_2K\ PO_4$, 5 g; glucose, I0 g ; $(NH_4)_2\ SO_4$ généralement 1 mM; pH final 5,0.

Milieu F1. Par litre : base de Wickerham (dose pour deux litres); $H_2K\ PO_4$, 0,I M ; glucose, 0,25 M ; $(NH_4)_2\ SO_4$, généralement 0,0I M ; pH final 4,5.

Ces milieux ont l'inconvénient d'être mal tamponnés, le pH descendant en fin de culture jusque vers 3; l'azote limite la récolte en fin de croissance exponentielle, mais pas toujours en fin de croissance totale, comme le montre le tableau I.

.....

Milieu	$(NH_4)_2 SO_4$ mM	récolte en fin de phase exponentielle		récolte finale (48h)	
		théorique	effective	théorique	effective
W1	1		200		800
	2	400	400	1 600	1 600
	3	600	600	2 400	1 700
F1	5	1 000	1 000	4 000	4 000
	10	2 000	2 000	8 000	6 000

Tableau I

Nature du facteur limitant du rendement de croissance sur les milieux W1 et F1.-

La récolte théorique est déterminée par extrapollation à partir de la récolte sur milieu à concentration azotée très faible (1 mM); case grise : azote effectivement limitant.

Milieux W2 et F2 étudiés pour que l'azote soit le facteur limitant du rendement de la croissance totale ; le pH a été élevé et le pouvoir tampon amélioré.

Milieu W2. Par litre : base de Wickerham ; tampon phosphates (dissodique et monopotassique), 40 mM, pH 6,5 ; glucose 10 g ; $(NH_4)_2 SO_4$ généralement 1 mM ;

Milieu F2.Par litre : base de Wickerham (dose pour 5 l) ; tampon phosphates(dissodique et monopotassique) 100 mM, pH 6,5 ; glucose 50 g ; $(NH_4)_2 SO_4$ 5 mM .

Les additifs ajoutés à ces milieux sont préalablement amenés au pH 6,5.

Ces milieux ne donnent pas encore entièrement satisfaction : l'azote limite le rendement dans toutes nos conditions de travail, et le pH ne descend guère en-dessous de 5, mais des sels minéraux précipitent au cours de la préparation ou de la conservation des milieux.

- Milieux W3 et F3.- Pour remédier aux inconvénients précédents dans une mesure compatible avec une bonne croissance, les milieux sont tamponnés à pH 6 respectivement par un tampon phosphate 40mM et par un tampon phosphate 100mM;la quantité de sels minéraux qui précipite est ainsi notablement diminuée.

Quand un milieu contient en outre un acide aminé, c'est indiqué par l'apposition à la référence du milieu des 3 premières lettres de l'acide aminé suivies de la concentration en mM (exemple : F3 lys 5).

Tous ces milieux sont stérilisés uniquement par filtration sous pression sur filtres Millipore GS (porosité 0,2 μ), contrôlés par incubation 3 jours à 37° et conservés au congélateur.

2.1.1.2. Milieux gélosés -

Pour les manipulations de génétique, ont été employés le milieu YEP (Snow, I966), le milieu de Wickerham correctement complémenté, le milieu de sporulation de Fowell (I952); tous ces milieux gélosés à 2 % sont stérilisés 30 min. à II0°C.

2.1.1.3. Mise en culture, contrôle des croissances, appareillage.-

Les inoculations s'effectuent à partir de précultures en phase exponentielle, elles-mêmes obtenues à partir de cultures sur milieu gélosé. Les croissances sont suivies par turbidimétrie à l'aide d'un photocolorimètre Beckmann, modèle C à 660 nm, les absorptions étant converties en poids sec (μ g/ml) grâce à une courbe d'étalonnage.

Pour les études de croissance en série, des fioles à diverticules (Wiame et Storck, I953) contenant 10 ml de milieu W sont utilisées. Les cultures destinées à la préparation d'extraits enzymatiques sont obtenues sur 4 l de milieu F dans un fermenteur New Brunswick, modèle F. 05 B, à équipement rudimentaire (agitation et

....

aération seulement); la croissance est alors suivie par mesure turbidimétrique sur des prélèvements dilués. Toutes les cultures ont lieu à 28°C, dans des conditions telles que l'aération n'est généralement pas limitante. Cependant, il est arrivé en particulier, lors de l'utilisation de fermenteurs couplés aérés par une seule pompe, que l'aération devienne limitante au cours de la phase post-exponentielle.

2.I.2. Production et caractérisation de mutants.-

Toutes les souches étudiées ont été obtenues dans notre laboratoire à partir de la souche haploïde 264-2 B (souches isogéniques).

Les souches auxotrophes ont été obtenues sous notre direction par D.R. Thouvenot, l'optimisation de la technique ayant fait l'objet d'un travail de D.E.A. suivi d'une publication (Thouvenot et Bourgeois, I97I); la méthode de base est celle de Snow (I966); les mutants sont produits par action de l'éthyl-méthane sulfonate, sélectionnés par la nystatine, isolés par replication et caractérisés par auxanographie.

Les mutants qui ont fait l'objet d'études biochimiques au cours de ce travail, ont été caractérisés de façon plus précise, par des tests nutritionnels, puis par des tests d'allélisme.

Les mutations de suppression des souches arg- ont été isolées par une culture prolongée, suivie d'un étalement sur milieu minimum sans aucun traitement mutagène.

Les mutants résistants à la lysine ont été obtenus par 30 cultures successives sur milieu liquide W1 additionné de lysine 1 mM et de nitrate de sodium 1 mM; chaque culture correspondait à environ I0 générations cellulaires et se poursuivait jusqu'en phase post-exponentielle, phase pendant laquelle peut s'exercer l'effet sélectif; l'asepsie de cette longue manipulation a été assurée par le fait que

....

les tubes étaient reliés et stérilisés ensemble (30 min. à 110°) avant inoculation du premier tube (figure 4).

La décision d'utiliser le nitrate résulte de la connaissance des effets mutagènes attribués à son métabolite, le nitrite, et de sa toxicité assez faible pour permettre des cultures répétées en sa présence ; c'est ainsi qu'en brasserie on a parfois attribué une dégénérescence des levains à la richesse en nitrates de l'eau de brassage.

2.1.3. Etude génétique des mutants ; hybridations.-

Ne disposant pas de micromanipulateur, nous avons limité le travail génétique au strict minimum.

Les mutants auxotrophes isolés et purifiés ont été soumis à des tests d'allélisme, qui ont permis en même temps de vérifier le caractère récessif de leurs mutations ; les souches tests arg- et lys- nécessaires à cette caractérisation nous ont été fournies par D. Mortimer.

Un recombinant haploïde arg-, arginase déficient a été obtenu par la méthode de l'isolement en masse. Les souches haploïdes sont mises en contact en milieu liquide; les diploïdes sont isolées après étalement sur milieu complet par double réplication sur un milieu à source d'azote constituée par $(NH_4)_2\ SO_4$, puis sur un milieu à source d'azote constituée par l'arginine ; les diploïdes résultant du croisement sont les seules cellules à pousser à la fois sur ces deux milieux. Un diploïde isolé et purifié est mis à sporuler ; après 3 ou 4 jours, les spores sont soumises à l'isolement en masse (voir Foxell, 1969). Les asques sont mis en suspension dans 5 ml de Ringer additionnés de 0,25 ml de suc d'escargot (Industrie biologique française - 92 - Gennevilliers), pendant 24 heures ; la suspension est ensuite agitée au broyeur Braun (15 sec. à 2000 t/min, en présence de 10 g de billes de 0,10 mm). Il a été vérifié que dans ces conditions la plupart des spores sont libérées sans être détruites ; ependant leur viabilité est faible. Les spores libérées des asques par ce traitement, sont ensuite séparées

....

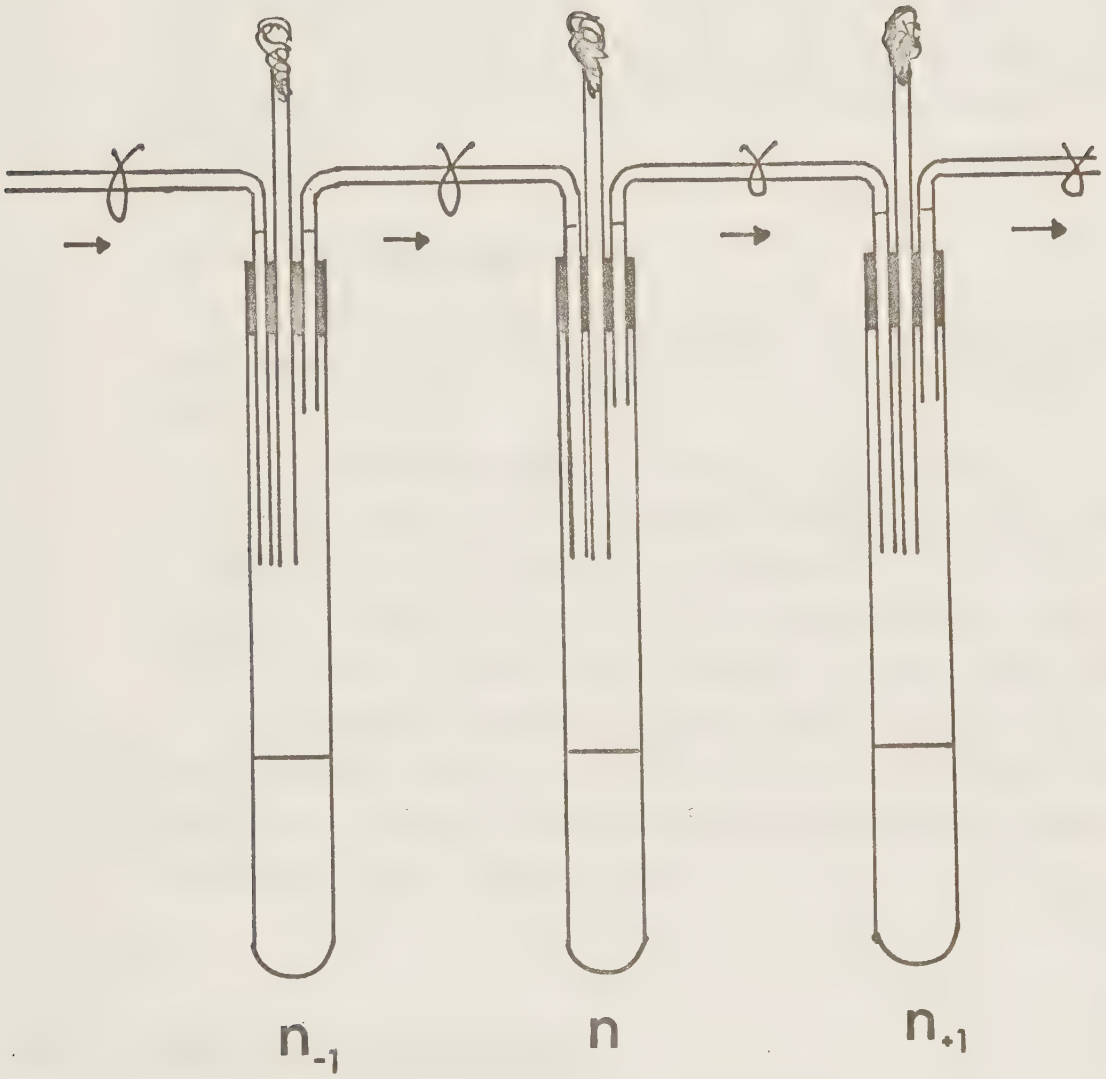


Fig.5. Dispositif utilisé pour la sélection des mutants lys R.

30 tubes fixés l'un à l'autre suivant leschéma et contenant le milieu à la lysine sont stérilisés. Le premier jour le tube n°1 est ensemencé dans des conditions d'asepsie parfaite ; les autres tubes sont inoculés ensuite de proche en proche : le jour n la densité optique de la culture n - 1 est mesurée par introduction directe du tube dans un photomètre, de façon à déterminer si la culture est largement sortie de la phase exponentielle ; puis la pince séparant les tubes n - 1 et n est momentanément desserrée et le 1/10 environ de la culture n - 1 est transféré dans le tube n.

des cellules par une double extraction à l'huile de paraffine, suivie d'un double rinçage de cette huile au liquide physiologique, puis étalées sur milieu complet; les souches isolées sont alors soumises à replication de façon à déterminer celles présentant la double anomalie.

2.I.4. Nomenclature.-

Les souches isolées sont , dès leur caractérisation biochimique grossière, affectées d'un symbole comprenant :

- l'indication de l'anomalie constatée,
- un nombre de 2 chiffres correspondant au numéro d'ordre de la manipulation d'isolement,
- un nombre de 2 chiffres caractérisant chaque mutant isolé au cours d'une manipulation. Ex. arg 06-98.

Après caractérisation génétique précise, la souche est désignée par le nombre de 4 chiffres défini précédemment, suivi entre parenthèse des indications génétiques obtenues. Ex. 06-98 (arg 7).

2.2. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.-

2.2.1 - Dosages d'azote et de protéines.-

Les dosages d'azote total dans certains milieux de culture ont été effectués par la méthode de Kjeldahl.

Les protéines ont été dosées par la réaction de biuret (Gornall, Bardawill et David, I949), avec la sérum-albumine bovine Fluka comme standard. La présence de glycérol dans le tampon dans lequel sont préparés certains extraits enzymatiques, diminue la sensibilité de la méthode (Zishka et Nishimura, I970) et oblige à préparer une courbe d'étalonnage correspondant à chaque prise d'essai utilisée; c'est-à-dire à chaque concentration de

....

glycérol : dans nos conditions de travail, pour des concentrations en glycérol dans le mélange réactionnel variant de 0 à 20 %, l'A^{540}_{10} par mg de protéine varie de 0,055 à 0,034, la relation A = f (concentration en protéine) restant cependant linéaire pour une concentration donnée de glycérol.

2.2.2. - Analyses et dosages de métabolites.-

L'extraction des acides aminés libres de la cellule a généralement été effectuée par la méthode de Sims et Folkes (I964), c'est-à-dire par l'éthanol à 60° à froid, puis par HCl 0,1 N à chaud; les acides aminés ont ensuite été analysés et dosés à l'aide d'un Autoanalyzer Technicon; les conditions de travail exactes ont été publiées (Bourgeois, I969).

Quelques dosages de lysine ont aussi été effectués par voie microbiologique en utilisant la souche 05-07 (lys 2), qui ne pousse ni sur α-aminoadipate, ni sur saccharopine à laquelle elle n'est sans doute pas perméable.

L'analyse des polyamines nous a créé de nombreuses difficultés. Elle a d'abord été tentée par la méthode de Morris, Koffron et Okstein (I969), c'est-à-dire à l'aide d'un analyseur automatique sur résine Bio-Rex 70 (minus 400 mesh). Les propriétés mécaniques gênantes de cette résine, jointes au fait que l'analyse par une autre méthode était nécessaire pour assurer l'identification, nous ont fait abandonner cette technique au profit de la chromatographie sur couche mince. Toutefois, cette résine est utilisée pour une séparation préliminaire rapide des aminoacides et des polyamines. Notre protocole de travail est décrit ci-dessous.

Un volume de suspension contenant généralement 50 à 200 mg, est filtré sur une membrane Millipore (porosité I,2 ou 3,0 μ); le filtre est lavé par 10 ml de liquide physiologique, puis jeté après avoir été découpé en bandes

....

dans un erlenmeyer contenant IO ml d'acide trichloracétique à 5 %, incubé I5 min à 65°C avec agitation. Le produit d'incubation est ensuite filtré également à 65°; cette température élevée est préconisée par Inouye et Pardee (I970) pour empêcher l'acétylation des polyamines, ce qui est en accord avec les résultats de Tabor et Dobbs (I970). L'extrait subit ensuite une triple extraction par un volume triple d'éther. Un volume mesuré de la fraction aqueuse est alors desséché sous vide à 65° et le produit est remis en solution dans du tampon pyridinium - acétate 0,4 M, pH 6.

La séparation des aminoacides et des polyamines s'effectue alors par la méthode de Morris et all. (I969), adaptée pour permettre une séparation rapide et aisée des deux fractions, sans chercher à en analyser les constituants. La résine Bio Rex 70 ($<$ 400 mesh) préalablement calibrée pour ne conserver que les grosses particules, est disposée en une colonne de 6 mm de diamètre et de 6 à IO cm de hauteur au moment du tassement maximum (sous acide) il s'agit d'une résine cationique faible. La colonne est thermostatée à 40°. Après dépôt de l'échantillon, l'élution par 20 ml de tampon pyridinium-acétate 0,4 M, pH 6, entraîne les aminoacides, puis l'élution par 10 ml d'acide acétique 5 N entraîne les polyamines. L'éluat contenant les polyamines est desséché en présence de 0,1 mg d'EDTA (Hammond et Herbst I968) à 65° sous vide et remis en solution dans un faible volume (1 ml à 0,2 ml) d'HCl N/IO ou de tampon 6. Dans certains cas, une extraction des polyamines par le butanol a été effectuée (Raina I964); elle est nécessaire avec des solutions riches en sels, mais ne l'est pas avec des extraits cellulaires (Morris et all. I969).

L'analyse du produit s'effectue alors par chromatographie sur couche mince de cellulose (plaques Merck) à 28°C. Deux systèmes d'élution sont utilisés :

....

- le mélange méthanol, pyridine, acide acétique, eau, 80,4,I,20, v/v (de la Llosa et all. I964), est utilisé habituellement pour l'analyse des aminoacides; comme il entraîne moins les polyamines que les aminoacides, il nous permet de contrôler les séparations sur colonne.
- le mélange butanol, pyridine, acide acétique, eau, 4,I,I,2, v/v (Morris et Pardee I966), sépare moins bien les aminoacides des polyamines, mais en revanche dans une solution de polyamines seules, il permet de bonnes séparations en des temps longs; pour bien séparer les polyamines migrant au voisinage de la spermine , nous avons utilisé généralement des migrations de 48 h. en cuve à élution continue.

Les plaques ont ensuite été révèlées à l'aide du réactif ninhydrine-cadmium de Heathcote et Haworth (I969); le dosage des polyamines s'effectue ensuite directement sur ces plaques par densitométrie à l'aide d'un appareil Vitatron. (*)

Pour rechercher les relations métaboliques existant entre certains métabolites, des autoradiographies de plaques ont été effectuées sur film Kodak, en des temps variant de 2 à 20 jours.

Enfin pour caractériser les polyamines décelées sur plaque, nous avons utilisé l'étude spectroscopique des combinaisons avec le dinitrofluorobenzène, le rapport des absorptions à 350 et 390 nm représentant un moyen d'identification intéressant (Mc Intire et al. 1953, Dubin 196(

2.2.3. - Etude de l'entrée des acides aminés à l'aide de produits marqués.-

Les acides aminés marqués ont été fournis par le CEA. Leur pureté radiochimique a été contrôlée par chromatographie sur couche mince, suivie d'une autoradiographie. L'entrée a toujours été étudiée sur des cellules en cours de croissance, sur un milieu normal additionné

*) Cet appareil a été mis aimablement à notre disposition par le Professeur G. SIEST, Directeur de l'UER Alimentation-Nutrition, Université de Nancy 1.

....

d'acides aminés marqués au ^{14}C, les radioactivités intracellulaires étant rapportées à l'unité de masse de matière sèche au moment du prélèvement.

Chaque prélèvement est filtré sur un filtre Millipore (porosité 0,2 μ) de 25 mm de diamètre; le filtre est ensuite rincé deux fois par 10 ml de liquide physiologique, séché et introduit dans une fiole à scintillation contenant 10 ml de toluène additionné de PPO (0,5 %) et de POPOP (0,01 %).

La radioactivité est mesurée dans un spectromètre Intertechnique, type SL 20*; la membrane n'introduit pas de quenching appréciable. En revanche, chaque fois que la radioactivité d'un échantillon aqueux a été mesurée, la procédure suivante a été utilisée : 0,2 ml de l'échantillon sont introduits dans 3,8 ml d'éthanol; on ajoute ensuite 10 ml de solution de comptage; l'éthanol rend l'eau miscible au toluène, mais l'eau et l'alcool introduisent un quenching appréciable; la méthode de l'étalon externe permet de calculer le nombre effectif de désintégrations par minute (d.p.m). Un nombre minimum de coups de 4 000 est compté, ce qui donne à $\frac{\sigma}{N}$ la valeur I,5 %.

2.2.4.- Synthèse des macromolécules.-

La synthèse des RNA est appréciée par l'étude de l'incorporation du ^{14}C uracile (GM) suivant un protocole voisin de celui de Bachrach et Weinstein (I970).

A 10 ml de milieu en fiole de croissance, on ajoute 0,5 ml de suspension de levure exponentielle lavée, puis au bout d'un laps de temps déterminé 0,5 ml solution de ^{14}C uracile et d'entraîneur telle que la concentration finale réalisée est 5 μ M et l'activité par unité de volume environ 0,25 μCi/ml. A intervalles, des volumes de 1 ml sont prélevés et ajoutés à 5 ml de solution d'acide trichloracétique à 6 % additionnée d'uracile 1 mM; après un séjour de 30 minutes à

...

*) Cet appareil a été mis aimablement à notre disposition par le professeur L. CHAPON, de l'Université de NANCY 1.

la température du laboratoire, les suspensions sont filtrées sur membrane de 25 mm, de porosité 0,2 μ . Après rinçage par 25 ml de solution d'acide trichloracétique à 6 % et d'uracile 1 mM, la membrane est séchée et introduite dans un flacon de scintillation.

L'étude de la synthèse protéïque s'étudie de la même façon en suivant l'incorporation de ^{14}C-L-leucine. On réalise pour cela dans les fioles une concentration de leucine 0,1 mM et une activité par unité de volume voisine de 0,25 μCi/ml. Les membranes sont rincées par une solution d'acide trichloracétique additionnée de L-leucine 1 mM.

2.2.5.- Essais enzymatiques.-

Les produits utilisés sont de la plus haute pureté disponible (Merck, Boehringer, Fluka, Calbiochem).
Les activités enzymatiques sont exprimées en nmoles de produit formé par min. et par mg de protéines (milliunités). Les mesures spectrophotométriques s'effectuent à l'aide d'un spectrophotomètre Beckmann DB ou dans certains cas d'un photomètre Beckmann I2II.

2.2.5.1 - Arginase.

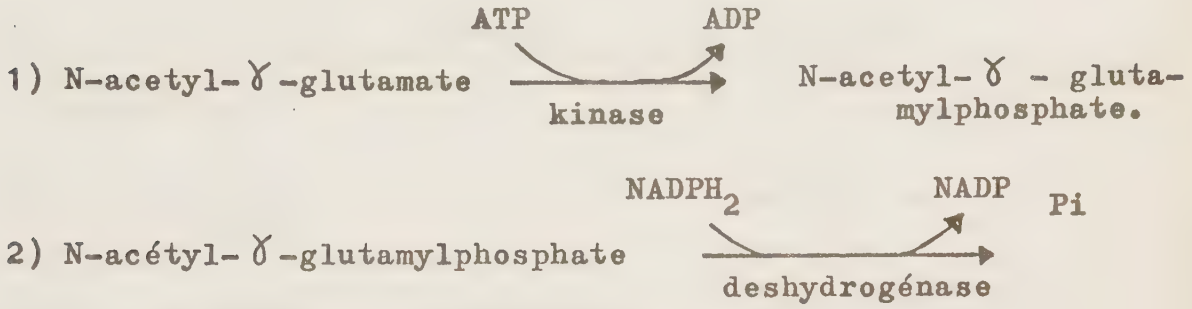
L'activation de l'arginase et le développement de l'activité arginasique s'effectuent suivant la méthode de Middelhoven (I964), mais l'urée n'est pas dosée par la méthode d'Archibald (I945) à l'isonitrosopropiophénone, mais par celle de Siest (I966, I968) utilisant la réaction à la diacétylmonoxime. Les détails expérimentaux ont été décrits antérieurement (Bourgeois et Thouvenot, I970).

2.2.5.2 - L'ornithine transaminase est dosée suivant la méthode de Middelhoven (I969), les détails expérimentaux ont été également fournis antérieurement (Bourgeois et Thouvenot, I970).

....

2.2.5.3.- Système enzymatique catalysant la transformation globale N-acetylglutamate ⟶ N-acétylglutamylsemialdehyde.-

Cette transformation comporte en fait deux réactions successives :



Seule la réaction (1) nous intéressait, mais plusieurs tentatives de dosage direct de la kinase étant restées vaines, c'est l'ensemble des deux réactions que nous avons étudié en suivant la cinétique de disparition du $NADPH_2$ (De Deken I962). L'étude a été effectuée à l'aide d'un photomètre Beckmann I2II pourvu d'un filtre interférentiel Intervex, présentant un maximum d'absorption à 347 nm; l'appareil était placé dans une enceinte thermostatée à 28°c.

Le broyage s'effectue dans les conditions décrites antérieurement (Bourgeois et Thouvenot , I970), mais dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 additionné de β mercaptoethanol 1 mM et d' EDTA 0,1 mM.

Après élimination des billes par une centrifugation 20 min à I6 000 g, suivie d'une clarification par une autre centrifugation 30 min à I00 000 g, le tout au voisinage de 3°C, la préparation est soumise à un fractionnement par le sulfate d'ammonium, effectué juste avant l'essai. Ce fractionnement est nécessité par l'existence dans l'extrait de $NADPH_2$ oxydases qui gènent la mesure.

....

Nous avons localisé l'activité étudiée dans la fraction 25 - 40 %, la saturation correspondant selon Vogel et Mc Lellan (I97I) à 0,72 g de $(NH_4)_2 SO_4$ par ml d'extrait à 0°C. A titre indicatif, nous indiquons ci-dessous les fractions utilisées par différents auteurs.

Auteurs	Espèce	Fraction
De Deken (I962)	S. cerevisiae	0 - 50 %
Baïch et Vogel (I962)	E. coli.	environ 24 à 55 %
Farago et Denes (I967)	Chlamydomonas	environ 24 à 40 %
Minet (I970)	S. cerevisiae	kinase 50 - 60 % deshydrogénase 70-90 % enzymes couplés : extrait brut.

Notre fraction est donc incluse dans celles utilisées par les autres auteurs, à l'exception de Minet. Nous n'avons pas précipité préalablement les acides nucléïques comme le font certains auteurs. D'autre part, tous nos essais de dessalage par dialyse ou sur Sephadex se sont soldés par la perte de toute activité.

La composition du milieu réactionnel est voisine de celle indiquée par De Deken (I962). Les réactifs sont introduits dans la cuvette photométrique, dans l'ordre suivant :

- Tris 1 M, pH 7,36 - 0,2 ml
- Acide N acétylglutamique neutralisé 200 mM - 0,2 ml
- $ATPNa_2$ neutralisé, 50 mM - 0,2 ml
- $Mg\ Cl_2$, 6 H_2O , I00 mM - 0,2 ml
- Eau ou additif éventuel - I,0 ml
- Enzyme - 0,2 ml
- Après préincubation de 5 min. $NADPH_2$, 2 mM - 0,I ml

Les résultats obtenus ne sont pas très satisfaisants; l'augmentation d'absorption observée lors de l'addition est très variable suivant les extraits enzymatiques et, en particulier, très faible avec les extraits concentrés, ce qui rend la mesure imprécise; il reste d'autre part une activité $NADPH_2$- oxydasique sensible; enfin le milieu réactionnel se trouble fréquemment après une dizaine de minutes.

CHAPITRE III - MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DE L'EFFET DE LA LYSINE SUR LA CROISSANCE.

3.I. MISE EN EVIDENCE ET ETUDE DE L'EFFET SUR LA CROISSANCE ETUDIEE PAR TURBIDIMETRIE (Bourgeois I969).-

La présence de lysine dans le milieu (fig. 6) se traduit par un double effet :

- élévation sensible de la vitesse de croissance pendant la phase exponentielle, accompagnée d'un léger allongement de cette phase.
- blocage de la croissance à une valeur de la quantité de matière sèche notablement inférieure à sa valeur habituelle.

L'accélération de la croissance et l'allongement de la phase exponentielle s'expliquent sans doute par le fait que la présence de lysine, assimilable quand elle n'est pas la seule source azotée (Ribereau-Gayon et Peynaud I966), a un effet d'épargne. L'avantage que représente pour la cellule le fait de ne plus avoir à synthétiser la lysine n'est pas négligeable, puisque cet acide aminé contient I5 à 20 % de l'azote protidique total de la levure (une analyse au début de la phase post-exponentielle a donné I8,3 %, résultat en accord avec ceux de Peynaud et Lafon-Lafourcade, I967).

Le blocage de croissance est plus difficile à expliquer; l'étude de l'effet d'un certain nombre de facteurs sur ce blocage a cependant fourni des résultats intéressants.

3.I.I. Influence des concentrations en sulfate d'ammonium et en glucose.-

Les figures 7 et 8 montrent deux types de courbes :

a) lorsque la concentration en sulfate d'ammonium est assez élevée pour que le rendement de la croissance soit limité

....

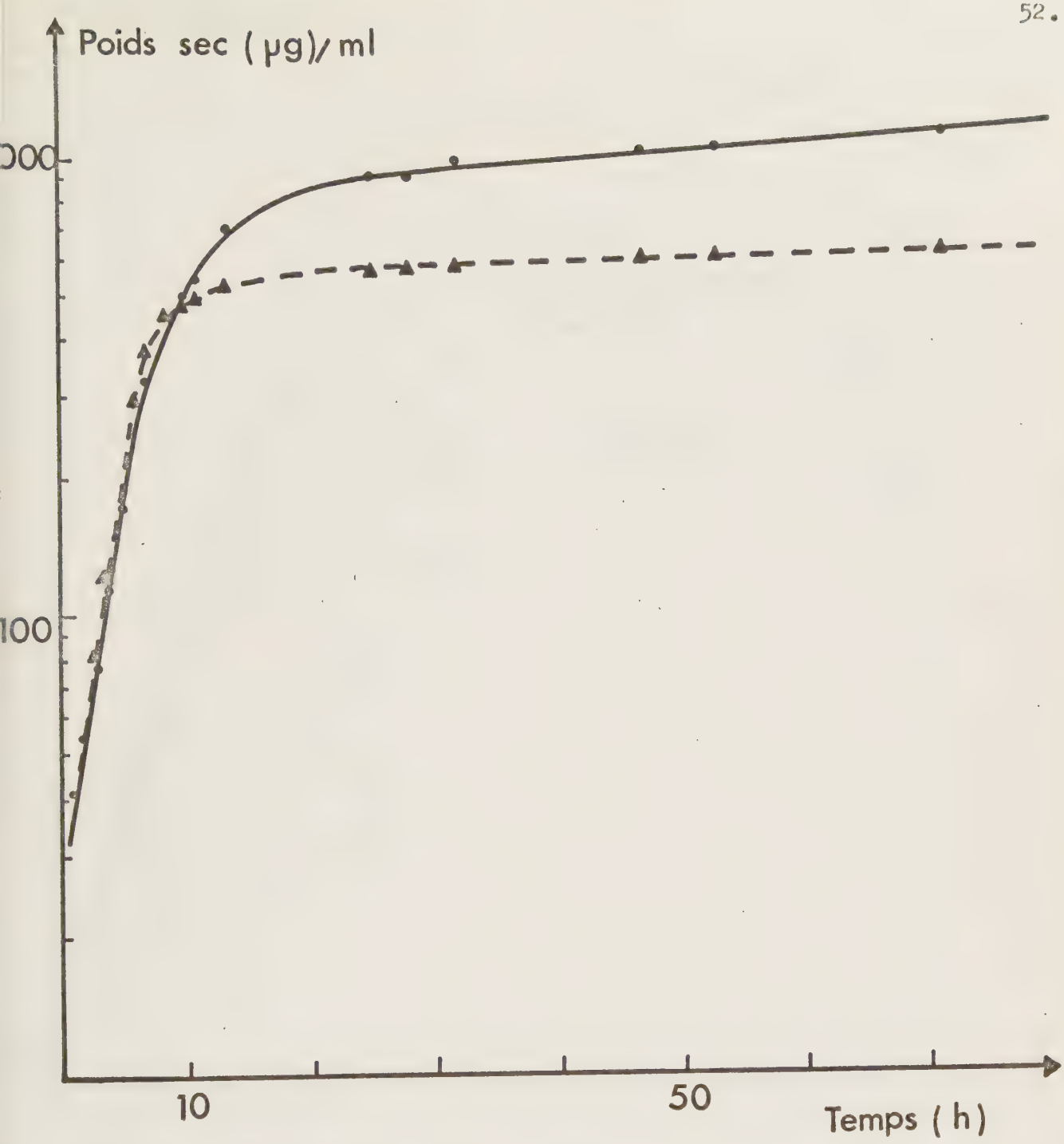


Fig.6. Mise en évidence de l'effet de la L-lysine sur la croissance étudiée par turbidimétrie.

——●—— témoin ; —▲— — + L-lysine 1mM.

Souche sauvage ; milieu W1.

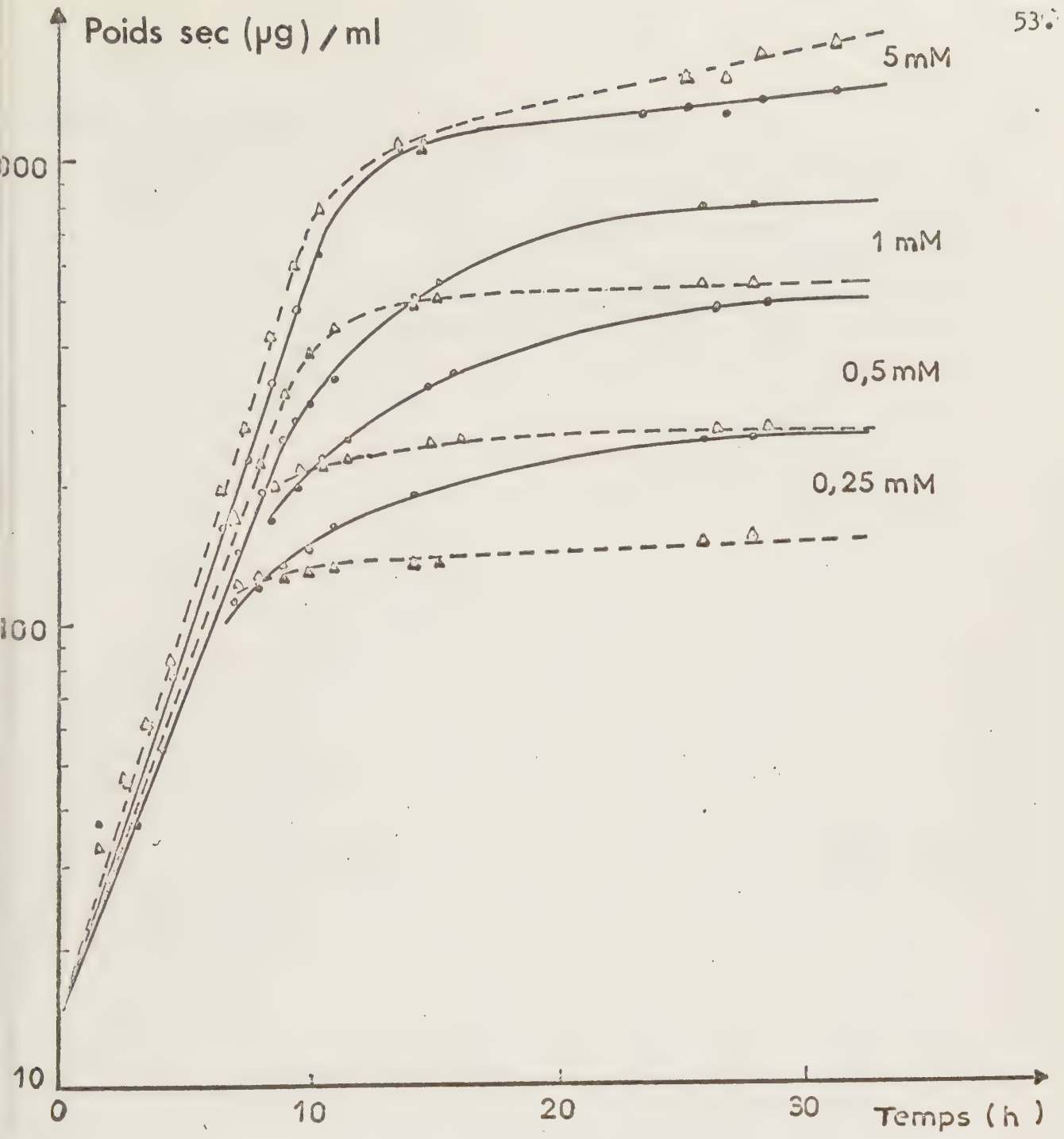


Fig.7. Effet de la L-lysine sur la croissance en fonction de la concentration du milieu en sulfate d'ammonium. (Bourgeois 1969).

—●— témoin ; - - ▲ - - + L-lysine 10 mM.

Souche sauvage ; milieu W_1 avec concentration en sulfate d'ammonium variable (indiquée sur le graphique).

Pour une concentration en sulfate d'ammonium 25 mM, les courbes sont analogues à celles obtenues pour 5 mM et leur sont pratiquement superposables. Elles n'ont pas été portées pour des raisons de clarté.

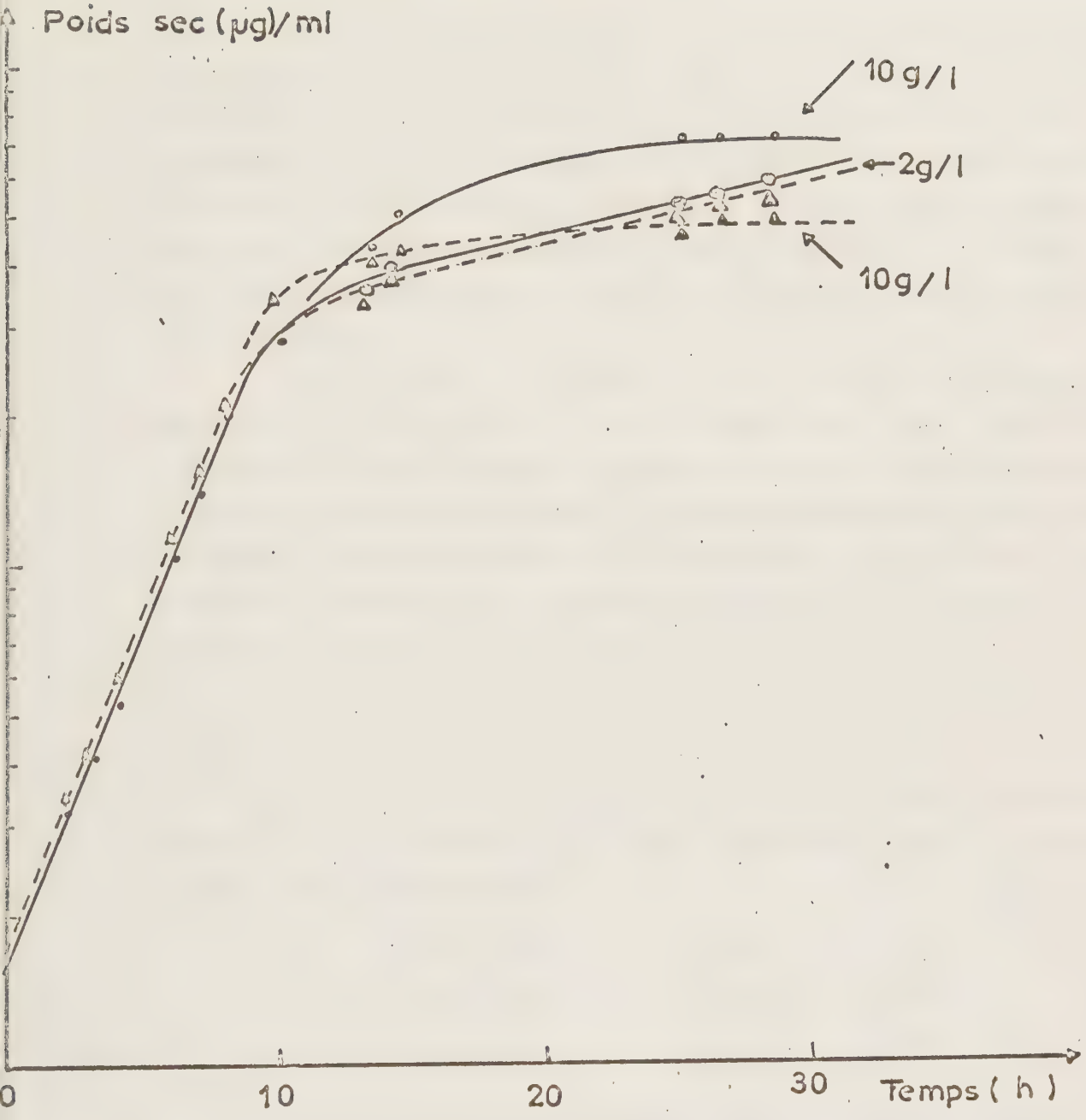


Fig.8. Effet de la L-lysine sur la croissance en fonction de la concentration en glucose. (Bourgeois 1969).

—●— témoin ; - -▲- - + L-lysine 10 mM.

Souche sauvage ; milieu W1 avec concentration en glucose variable : ●▲ 10 g/l; ○△ 2 g/l.

Pour une concentration en glucose de 50 g/l, les courbes sont analogues à celles obtenues par 10/1 et leur sont pratiquement superposables. Elles n'ont pas été portées pour des raisons de clarté.

par la concentration en glucose, les courbes présentent en coordonnées semi-logarithmiques deux tronçons rectilignes traduisant deux valeurs successives du taux de croissance (diauxie), le premier tronçon correspondant à la dégradation du glucose et le second à celle de l'éthanol formé. Quand la courbe de croissance est de ce type, la présence de lysine IO mM élève légèrement le taux de croissance pour la raison déjà indiquée.

b) lorsque la concentration en sulfate d'ammonium représente le facteur limitant du rendement final, les courbes de croissance sans lysine ne présentent qu'un tronçon linéaire et la phase post-exponentielle est caractérisée par un ralentissement très progressif de la croissance. La présence de lysine se traduit,dans ce cas, par une élévation du taux de la croissance suivie d'une baisse du rendement dont l'importance varie en fonction de la concentration du milieu en sulfate d'ammonium (pour des valeurs données de la concentration en glucose et de l'inoculum) : pour une concentration en glucose 55,5 mM (IO g/l) et un inoculum de I5 μ g/ml, les baisses observées de la quantité de levure produite après 30 heures de culture sont les suivantes :

- $(NH_4)_2\ SO_4$ 1,00 mM : 3I %
- $(NH_4)_2\ SO_4$ 0,50 mM : 44 %
- $(NH_4)_2\ SO_4$ 0,25 mM : 43 %.

Les réductions indiquées sont nettement inférieures aux baisses réelles de rendement, si l'on tient compte du fait que la lysine étant incorporée dans les protéïnes et satisfaisant probablement à tous les besoins en lysine de la cellule, permet une importante économie de $(NH_4)_2\ SO_4$, ce qui devrait donc élever sensiblement la densité microbienne en fin de croissance. L'examen des courbes montre, d'autre part, que la lysine n'agit négativement que sur la croissance post-

.....

exponentielle, la phase exponentielle étant même légèrement allongée en présence de lysine.

3.I.2. Influence de quelques autres facteurs.-

Tous les essais sont effectués dans des conditions telles que le rendement de la croissance soit limité par le taux d'azote du milieu.

Concentration en lysine (figure 9).

Pour des concentrations respectives en glucose et sulfate d'ammonium 55,5 mM et 0,5 mM et un inoculum de I5 µg/ml, le blocage de la croissance post-exponentielle par la lysine est total à la concentration 2 mM. Le freinage est encore considérable à 0,4 mM. Une autre expérience a montré que, pour des concentrations respectives en glucose et sulfate d'ammonium 250 mM et 5 mM (milieu F_2 ou F_3) et un inoculum de 45 µg/ml, le freinage apparaît entre I et 2 mM et le blocage est total au-dessus de 2 mM.

Le dosage de la lysine intracellulaire dans les conditions du blocage a révèlé des concentrations de l'ordre de 500 à 600 µmoles/g sec. (Tableau II).

Souche	Milieu	Conditions	Lysine µmoles/g sec.
sauvage	Wickerham lys.I0	phase exponentielle	420
sauvage	Wickerham lys.I0	2 g après fin phase exponentielle	620
sauvage	F_3 lys. 5	2 g après fin phase exponentielle	630
sauvage	F_3 lys. 2	2 g après fin phase exponentielle	520

Tableau II - Concentrations intracellulaires de lysine atteintes dans différentes conditions. -

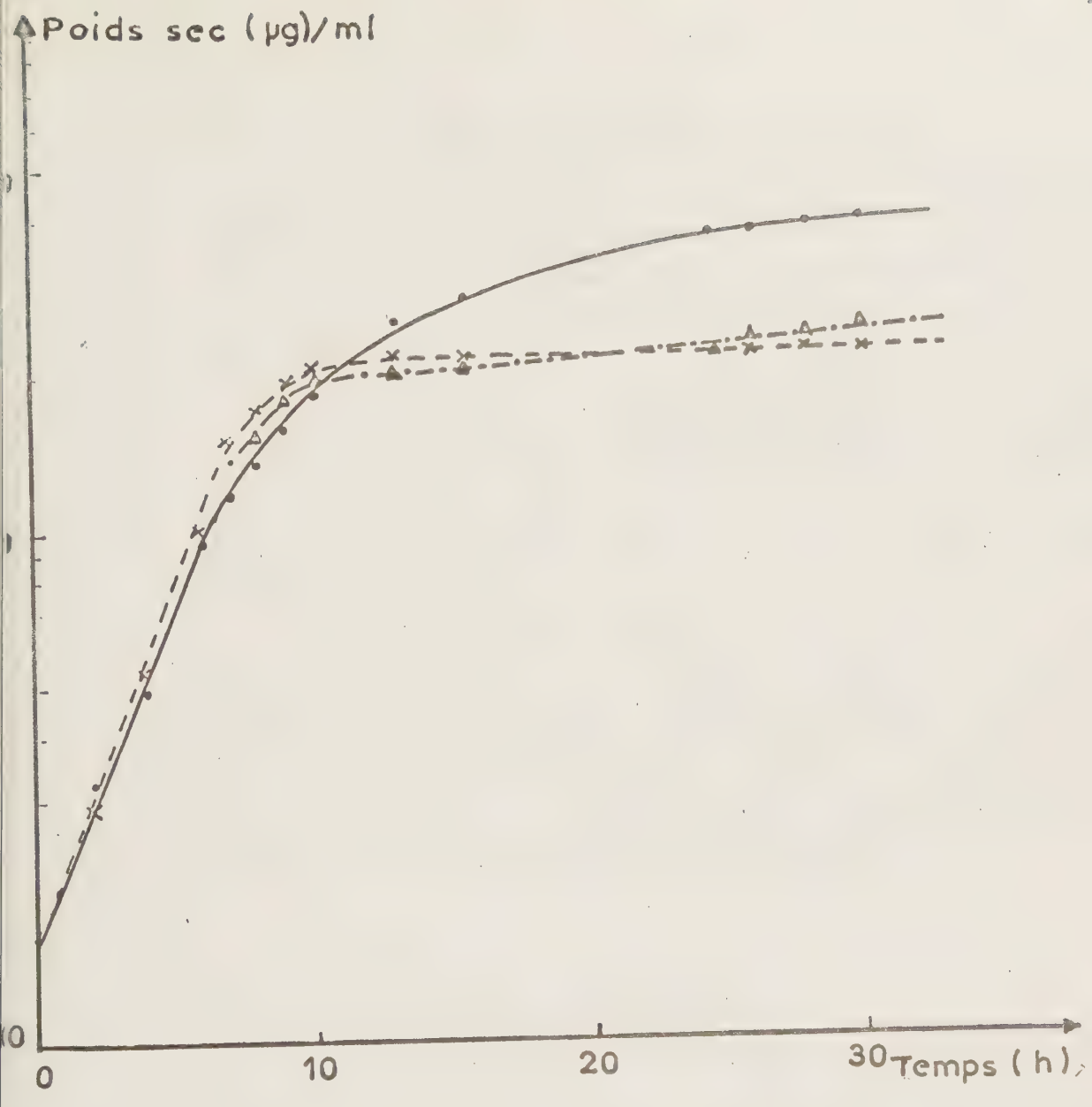


Fig.9. Effet de la L-lysine sur la croissance en fonction de la concentration du milieu en lysine. (Bourgeois 1969).

Souche sauvage ; milieu W_1 (sulfate d'ammonium 0,5 mM) avec concentration en lysine variable : ——●—— témoin ;
●—.▲.— + L-lysine 0,4 mM ; —▲— + L-lysine 2 mM.
Pour une concentration en L-lysine de 10 mM la courbe est superposable à celle obtenue pour 2 mM ; elle n'a pas été portée pour des raisons de clarté.

Valeur de l'inoculum (figure IO).

La baisse relative de rendement est d'autant plus importante que l'inoculum est plus faible : pour une concentration en sulfate d'ammonium 0,5 mM, elle est de 42 % pour un inoculum de 20 µg/ml, de 51 % pour un inoculum de 0,5 µg/ml (après 40 h).

Moment de l'addition de lysine (figure II).

Le stade de la croissance auquel se produit le blocage et par suite la baisse relative du rendement de croissance sont pratiquement indépendants du moment auquel a lieu l'addition de lysine.

De tout ce qui précède, il résulte que la lysine ne bloque la croissance que lorsque la cellule est dans des conditions physiologiques bien déterminées, conditions liées en particulier à sa nutrition azotée. Le blocage ne se manifeste que pendant la croissance post-exponentielle qu'il convient donc d'étudier avec précision.

3.I.3. Généralités du phénomène.-

Le comportement d'un certain nombre d'espèces de levures a été étudié dans les conditions habituelles. Les résultats de ce travail sont présentés au Tableau III.

En ce qui concerne l'aptitude des espèces à utiliser la lysine, nos résultats sont conformes aux données bibliographiques (Walters et Thiselton I953). Il est évident, d'autre part, que les espèces qui utilisent la lysine en tant que source d'azote ne peuvent manifester l'effet lysine, mais il s'avère qu'inversement les espèces testées qui ne peuvent l'utiliser sont toutes sensibles à cet effet, qui n'est donc pas particulier à la souche 264-2 B.

.....

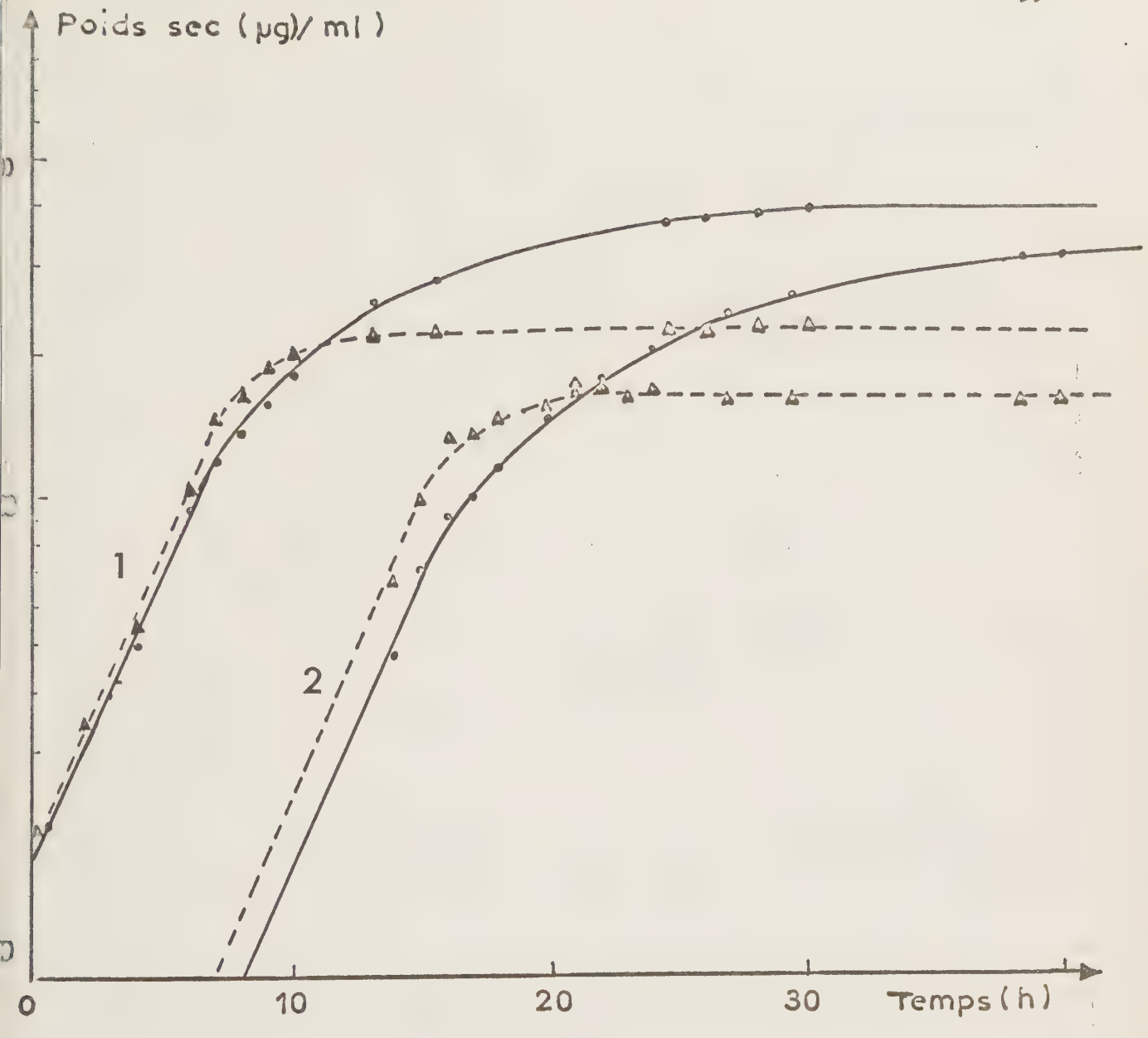


Fig.10. Effet de la L-lysine sur la croissance en fonction de la taille de l'inoculum.(Bourgeois 1969).

Souche sauvage ; milieu W_1, sulfate d'ammonium 0,5 mM.

——●—— témoin ; — — —▲— + L-lysine 10 mM ;

1 ● ▲ inoculation à 15 µ g/ml;

2 ● ▲ inoculation à 0,5 µ g/ml.

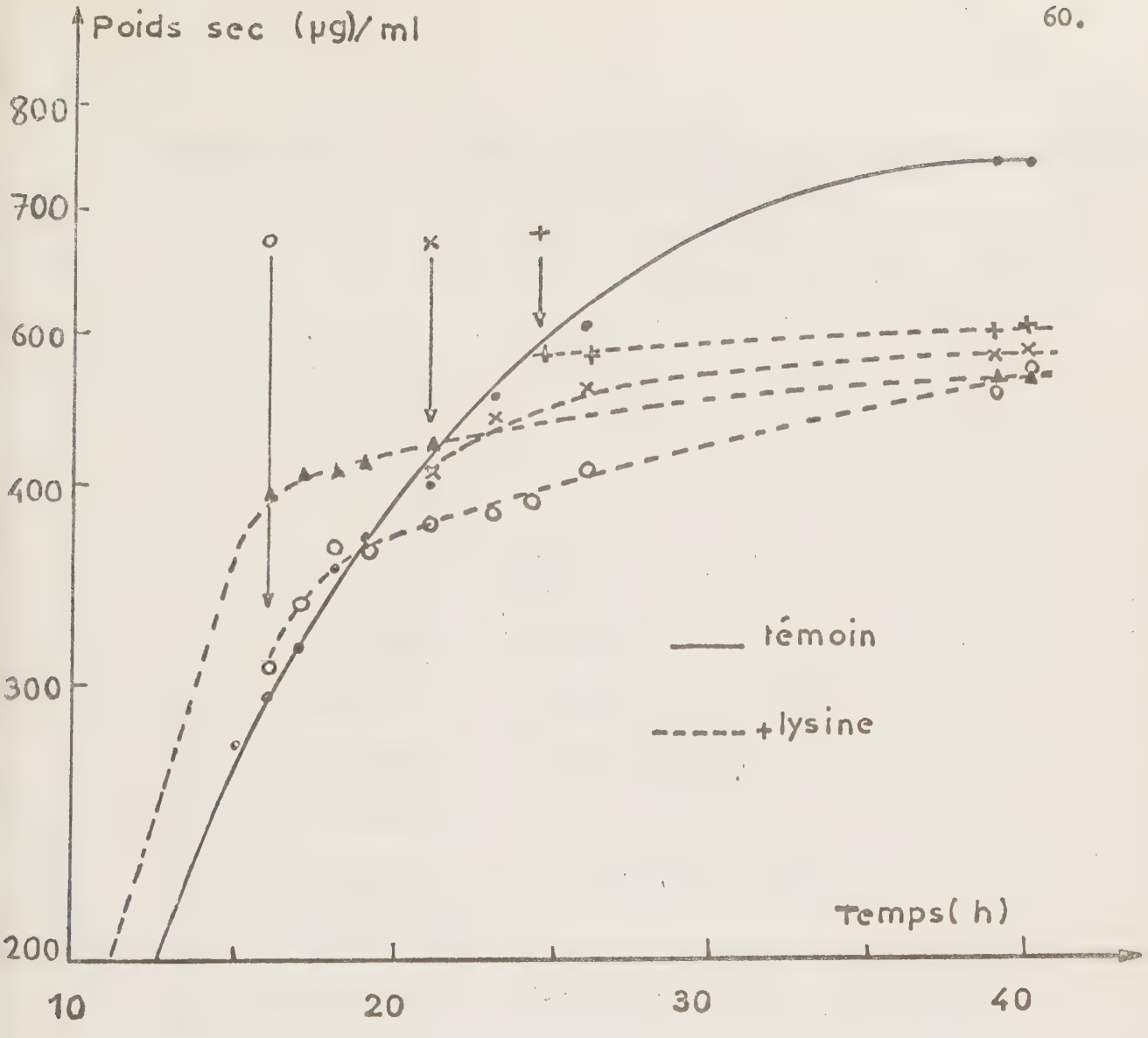


Fig.11. Effet de la lysine sur la croissance en fonction du moment de l'addition.(Bourgeois 1969).

Souche sauvage ; milieu W_1.

———— témoin ; — — — — + L-lysine 10 mM ajoutée aux moments précisés par les flèches.

Tableau III - Comportement de quelques espèces de levures à l'égard de la lysine :

1 : utilisation en tant que source d'azote,

2 : effet lysine.

(Les informations sont tirées de l'étude de la croissance sur W_3 et W_3 lys. 1).

Espèces	1	2
S. cerevisiae (haploïde, 264 - 2 B)	-	+
S. cerevisiae (diploïde, I P - B 218)	-	+
S. cerevisiae (brasserie, E.S.B.M.B.A. 59)	-	+
S. cerevisiae - var. ellipsoïdeus	-	+
S. carlsbergensis (brasserie, E.S.B.M.B.A 61)	-	+
S. chevalieri	-	+
S. diastaticus	-	+
S. marxianus	+	-
S. willianus	-	+
Hansenula anomala	+	-
Hansenula saturnus	+	-
Candida utilis	+	-

3.2. ETUDE DE LA CROISSANCE POST-EXPONENTIELLE EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE LYSINE.

3.2.I.- Signification de la phase post-exponentielle et localisation de l'effet de la lysine au cours de la croissance.-

Bien que la fin de la phase exponentielle soit difficile à préciser, et que les croissances n'aient pas été suivies jusqu'à arrêt total, on peut calculer que la phase post-exponentielle correspond,dans nos conditions expérimentales, à une multiplication du taux de matière sèche par 3,I environ (moyenne des valeurs suivantes obtenues dans différentes conditions : 3,3 - 2,6 - 3,2 - 3,2 - 3,4). Or, l'étude de l'évolution du taux d'azote au cours de la culture (figure I2), montre qu'en fin de phase exponentielle, le taux d'azote dans le milieu est très bas, de l'ordre du I/IO du taux initial. Donc la phase post-exponentielle ne représente pas simplement une phase de ralentissement de croissance, lié à l'épuisement progressif du facteur limitant, mais une phase de croissance lente qui s'observe après épuisement total du facteur limitant.

On sait depuis longtemps (Hartelius I934) que des levures prélevées en phase exponentielle et cultivées sans azote sont capables de multiplier leur masse de matière sèche par 3 environ; la phase post-exponentielle correspond donc précisément à un tel accroissement réalisé sans apport d'azote exogène.

Or l'action de la lysine a été localisée à la phase post-exponentielle : elle arrête cette croissance s'effectuant sans apport d'azote exogène; elle doit donc vraisemblablement bloquer aussi l'accroissement des levures transférées sur milieu dépourvu de source d'azote; c'est ce que confirme l'expérience (figure I3); le transfert sur milieu sans azote nous offre donc un second moyen d'étudier le phénomène qui nous intéresse.

...

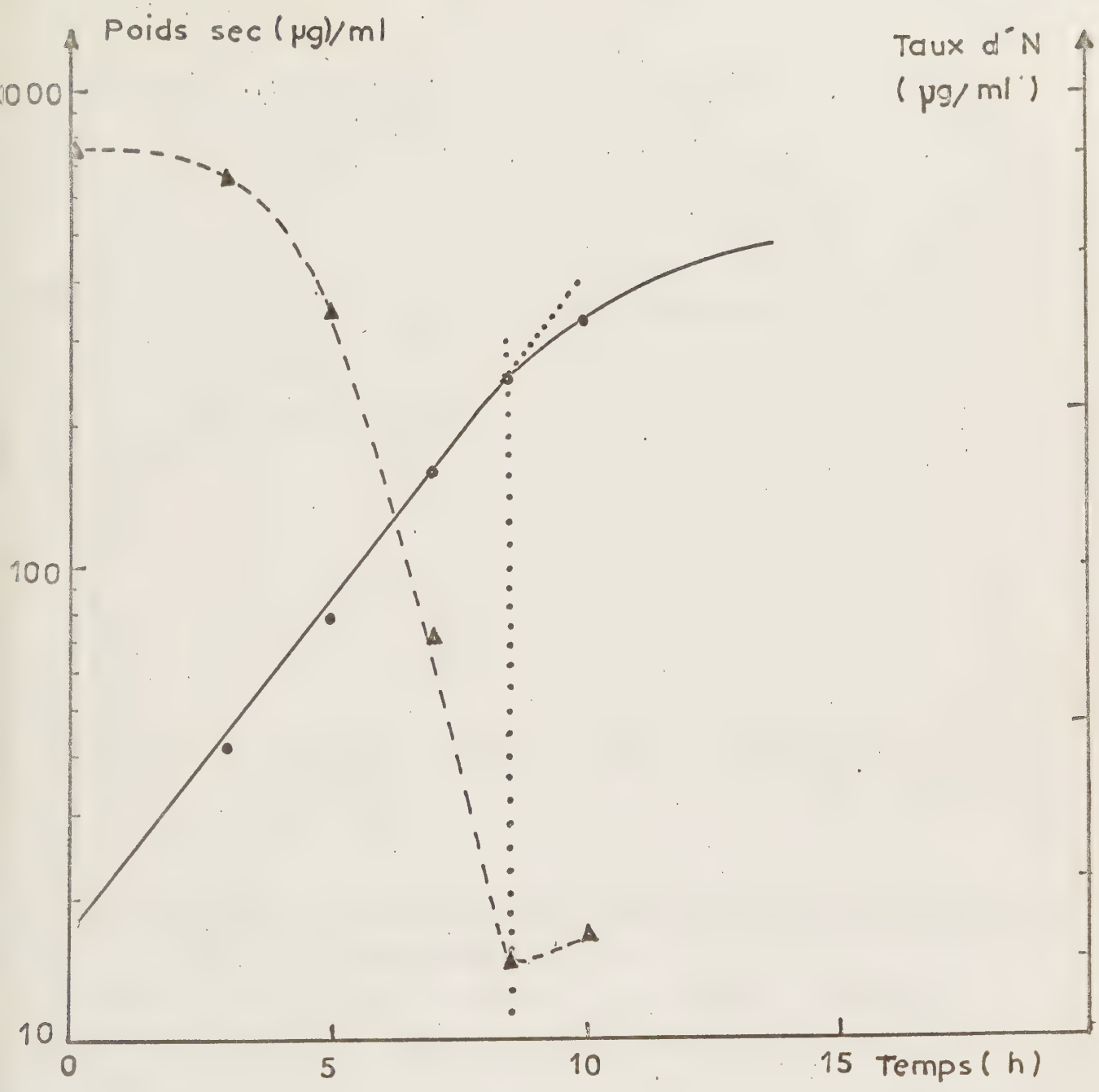


Fig.12. Etude parallèle de la croissance (coordonnées semi-logarithmiques) et de l'évolution du taux d'azote dans le milieu (coordonnées arithmétiques). (Bourgeois 1969).

——— poids sec ; — — — taux d'azote.

Souche sauvage ; milieu W_1 ; sulfate d'ammonium 1 mM (28 mg d'azote par 1) ; culture de 500 ml en erlenmeyer dont sont prélevés pour dosage des volumes de 50 à 100 ml.

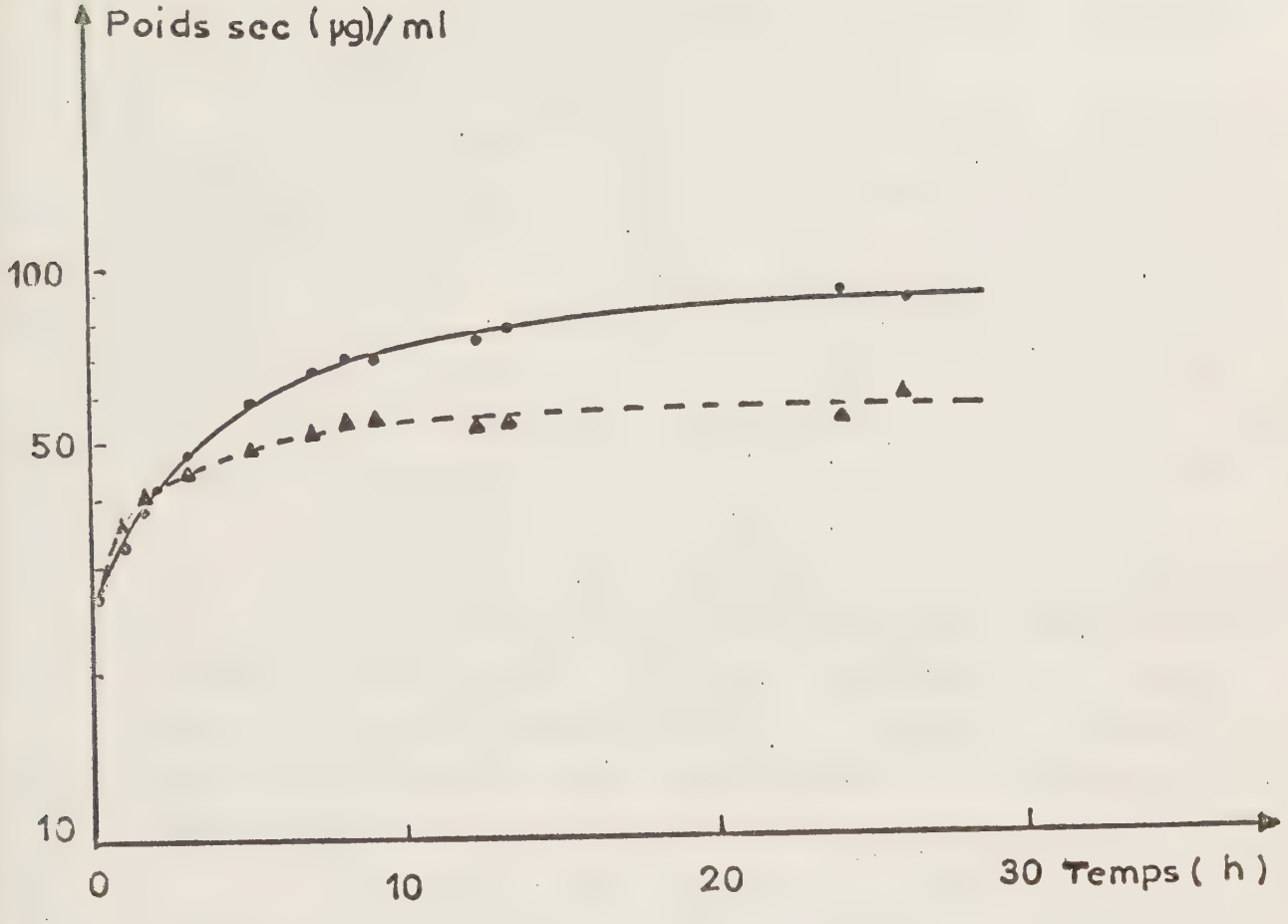


Fig.13. Effet de la lysine sur la croissance d'une culture soumise au jeûne azoté. (Bourgeois 1969).

Souche sauvage ; milieu W_1 sans sulfate d'ammonium.

——●—— témoin ;— -▲- — + L-lysine 10 mM.

3.2.2.- Comportement des cellules au cours de la phase post-exponentielle.-

Tout ce qui précède repose uniquement sur des données photométriques; or, la courbe d'étalonnage qui permet de déterminer le poids sec en fonction de la densité optique a été obtenue à partir d'une culture en phase exponentielle. Il est donc utile de contrôler l'effet réel de la lysine sur la croissance par une étude directe de son action sur la cinétique de l'évolution de la densité cellulaire (µ g/ml) et de la concentration cellulaire (nombre de cellules/ml).

Ces expériences ont confirmé en premier lieu que la relation densité optique=f(densité cellulaire)et surtout la relation densité optique=f(concentration cellulaire) varient en fonction du stade de croissance considéré : le rapport densité cellulaire/densité optique s'abaisse d'environ 20 % quand on passe de la phase exponentielle à la phase post-exponentielle.

Cependant, comme le montre la figure I4, cette constatation ne remet pas en cause l'essentiel : l'effet lysine se fait sentir non seulement sur la cinétique de la variation de densité optique de la culture, mais aussi sur celle de la variation de densité microbienne mesurée directement par pesée.

En revanche, la phase post-exponentielle ne correspond à aucun accroissement de la concentration cellulaire, et représente donc une simple augmentation de la masse cellulaire sans division; la lysine n'engendre donc aucune modification de la concentration cellulaire finale; son action se limite à une inhibition de l'accroissement de la taille cellulaire.

Corrélativement avec cet effet sur la taille cellulaire moyenne, la lysine modifie sensiblement les caractéristiques cytologiques de la cellule post-exponentielle.

....

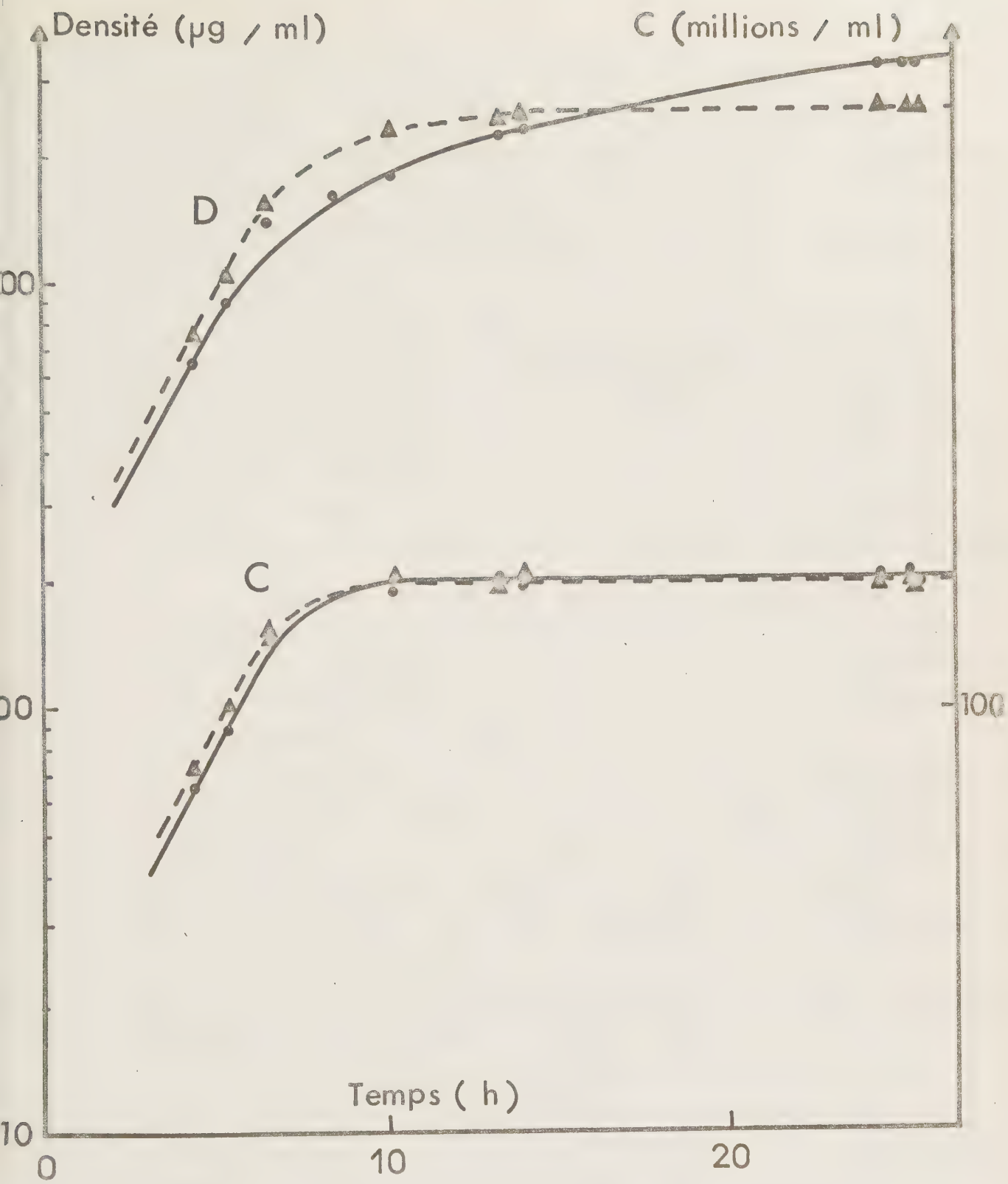


Fig.14. Croissances suivies par détermination directe de la densité (D) et de la concentration cellulaires (C).

Souche sauvage ; milieu F_3 .

—●— témoin ; — -▲- — + L-lysine 5 mM.

Lors du comptage hématimétrique, les bourgeons sont dénombrés en même temps que les cellules. Chaque dénombrement a été effectué sur au moins 2 000 cellules et au moins 5 préparations différentes.

L'examen des photographies (figure I5) fait apparaître :

- une plus grande variabilité de taille en présence de lysine, certaines cellules atteignant des dimensions importantes alors que les bourgeons restés fixés sur leurs cellules-mères restent très petits, leur croissance semblant totalement bloquée.

- une vacuolisation accrue en présence de lysine, qui a pour conséquence le rejet du cytoplasme et de ses inclusions à la périphérie de la cellule : cette vacuolisation est vraisemblablement due à l'élévation de la pression osmotique intravacuolaire, liée à l'accumulation de lysine; il est en effet connu que la lysine est l'un des produits susceptibles de s'accumuler dans la vacuole (voir Matile,I969).

L'examen direct des cellules vivantes a de plus mis en évidence que les mouvements de cyclose très actifs dans les cellules cultivées sur milieu minimum sont inexistants en présence de lysine; ce fait est peut-être dû simplement à l'accroissement de la vacuolisation.

Les caractéristiques aberrantes des cellules sur lysine nous ont suggéré de comparer les temps de latence respectifs de cellules cultivées en présence et en absence de lysine, lors d'un transfert sur milieu sans lysine; mais il s'avère que les temps de latence ne sont pas significativement différents.

Remarque.- La méthode auxanographique permet aussi de mettre en évidence très nettement l'effet lysine.

Si à la surface d'un milieu minimum gélosé dans lequel ont été incluses des cellules d'un mutant valine-, on dispose un disque imbibé de valine, on voit se développer autour du disque une auréole opaque. Si au contraire, il s'agit d'un mutant lysine- il se développe autour du disque imbibé de lysine un anneau coupé nettement vers l'intérieur, ce qui traduit une inhibition de croissance entraînée par la lysine quand sa concentration est trop élevée (figure I6). Cet effet particulièrement net est sans doute dû au fait que, sur milieu gélosé, la croissance n'est pas exponentielle mais limitée en particulier par la vitesse de diffusion des substances nutritives. L'arginine antagonise cette inhibition, comme le montre l'aspect de l'auréole entourant le disque 1.

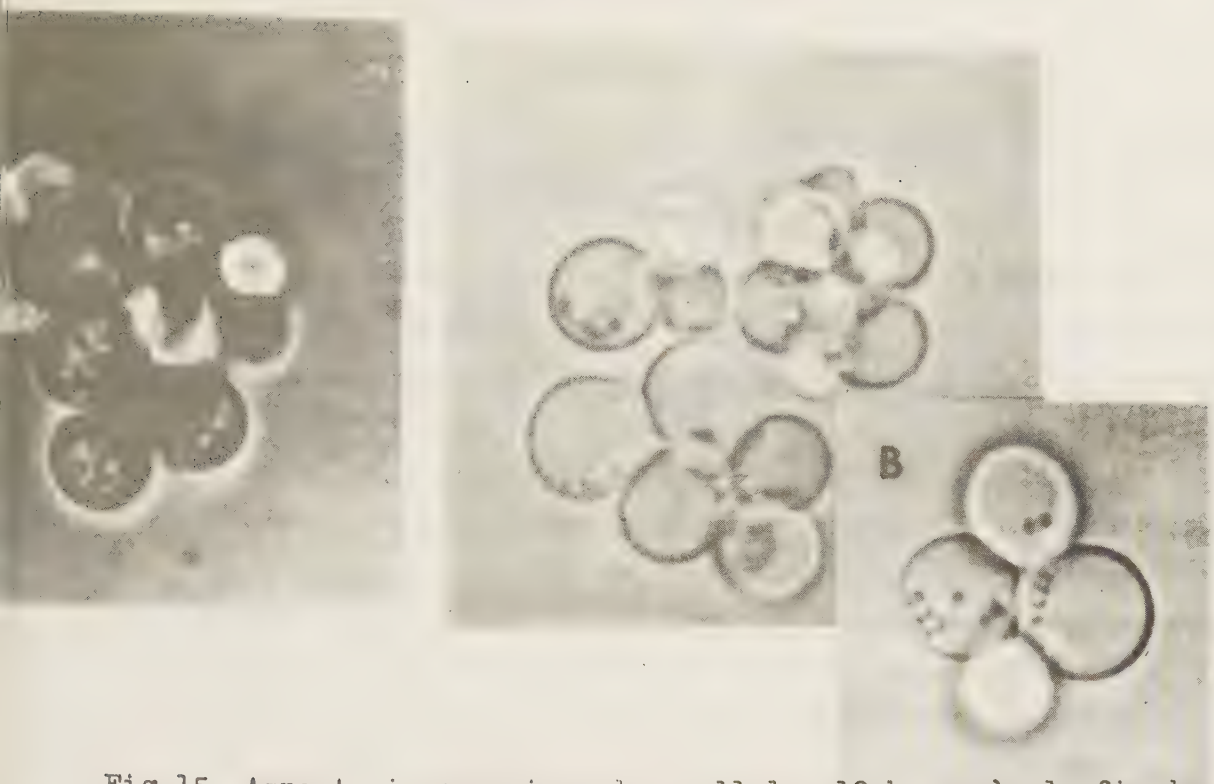


Fig.15. Aspect microscopique des cellules 12 h après la fin de la phase exponentielle.

Souche sauvage ; culture sur W3.
A : témoin ; B : + L-lysine 1 mM.
Ces photographies ont été réalisées au laboratoire du Professeur DOLLANDER (laboratoire d'embryologie - Médecine - Nancy) avec l'aimable assistance de M. G. CURY, chargé de recherche.

Fig.16. Auxanogramme d'un mutant lys- (photo tirée de la thèse de D. THOUVENOT 1971).
disque 1 = arginine + cystéine + lysine + méthionine.

3.3. L' "EFFET LYSINE" EN PHASE EXPONENTIELLE - ACTION DU L- α-AMINOADIPATE.

Des expériences précédentes, il ressort que quel que soit le moment de l'addition de lysine, l'inhibition de la croissance cellulaire ne se manifeste qu'en phase post-exponentielle. Est-ce à dire que ce phénomène est réellement impossible à obtenir en phase exponentielle ?

L'utilisation de concentrations de lysine très élevées, jusqu'à 80 mM sur milieu F_2 n'a permis d'obtenir aucune modification du phénomène habituel. Toutefois, le Tableau II en montrant que l'accroissement du taux de lysine intracellulaire ne suit que très partiellement l'élévation de sa concentration dans le milieu, suggère que l'aptitude de la cellule à concentrer la lysine est limitée.
D'où l'idée de tester l'effet du L - α -aminoadipate dont les propriétés ont déjà été signalées au paragraphe I.2.I. : son entrée est, suivant les souches, soumise de la part de la lysine, à une action inhibitrice ou repressive, mais en revanche sa conversion en lysine ne semble freinée par aucun mécanisme de régulation efficace; il doit donc, si l'entrée est suffisante, permettre d'obtenir des concentrations intracellulaires de lysine libre très élevées.

Les essais ont été effectués sur milieu F (sulfate d'ammonium IO mM), car sur milieu W dont le taux d'azote est faible (sulfate d'ammonium 1 mM), le gaspillage d'azote qu'entraîne la transformation du L-α-aminoadipate en lysine empêcherait d'interprèter les résultats : on ne saurait pas si la croissance s'arrête par suite d'une inhibition ou d'une carence azotée.

Le L- α - aminoadipate est efficace sur milieu F_1 (pH 4,5), mais non sur F_2 (pH 6,5) ni sur F_3 (pH 6,I), ce qui tient sans doute à une mauvaise pénètration aux pH trop élevés. Enfin, l'expérience s'est déroulée en présence

....

de lysine (milieu F_1 lys. 5), malgré l'effet de cette lysine sur l'entrée de l' α-aminoadipate, pour permettre la croissance de tous les lys- ; il a d'ailleurs été vérifié que les effets du produit à la concentration 5 mM sont rigoureusement identiques sur F_1 et F_1 lys 5.

La figure I7 montre que, quand le taux de L-α-aminoadipate passe de 0 à 5 mM, le temps de génération g passe de I h 50 à I5 h., ceci pour la souche sauvage; un nouveau g stable est atteint après environ 6 h. Le fait que le blocage de croissance ne soit pas total, ainsi que le fait que le même phénomène s'observe avec des inocula très faibles empêchent d'expliquer l'inhibition par épuisement précoce des ions NH_4^+ piégés par la conversion de l'α-aminoadipate en lysine.

L'action du produit à la concentration 5 mM a également été testée chez divers mutants lys- (figure I8 et tableau IV). Chez les mutants dont la déficience métabolique se situe en amont de la lysine, l'effet est analogue à celui observé chez la souche sauvage, c'est-à-dire que le temps de génération s'allonge fortement après environ 6 h, ce qui entraîne une réduction sensible de la densité cellulaire à 24 h (de 54 à 86 %). Au contraire, chez les mutants dont la déficience se situe entre α-aminoadipate et lysine, l'effet est nettement plus limité, la réduction de densité cellulaire à 24 h variant de 24 à 34 %.

La comparaison des effets sur ces deux types de mutants montre que le L-α-aminoadipate agit essentiellement par l'intermédiaire de la lysine qu'il engendre, l'effet résiduel observé chez les mutants incapables de réaliser la conversion s'expliquant peut-être par une action sur l'entrée de la lysine.

Permet-il d'atteindre une concentration intracellulaire plus élevée ? La concentration en lysine dans le OI-I02, 6 h après transfert sur milieu à l' α-aminoadipate, n'est que de l'ordre de 200 μmoles/g sec, ce qui est

.....

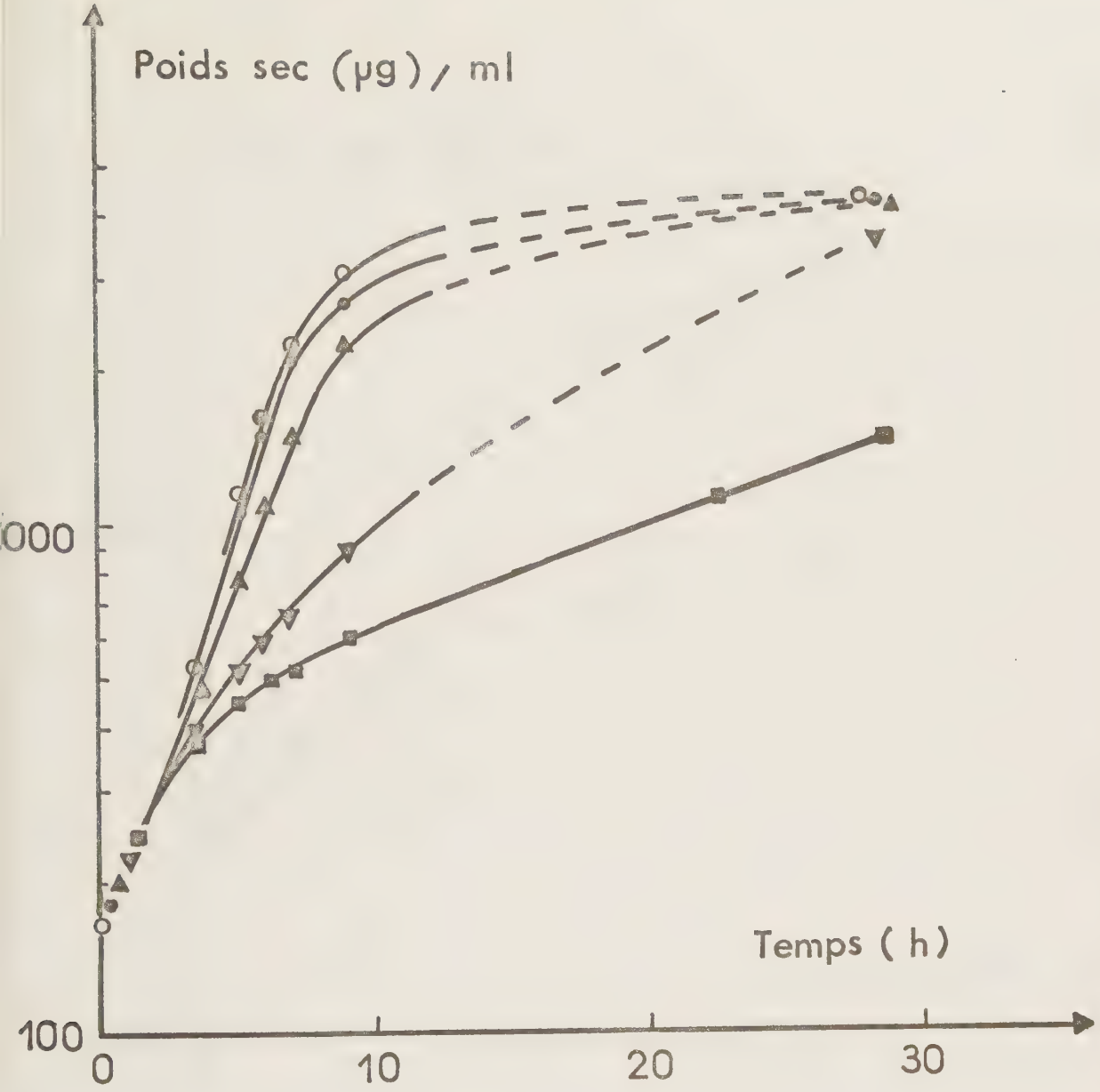


Fig.17. Effet du L-α-aminoadipate sur la croissance de la souche sauvage en fonction de la concentration.

Milieu F_1 lys 5 ; sulfate d'ammonium 10 mM.

- ○ témoin ; ● + L-α-aminoadipate 0,62 mM.
- ▲ + L-α-aminoadipate 1,25 mM ;
- ▼ + L-α-aminoadipate 2,5 mM ;
- ■ + L-α-aminoadipate 5 mM.

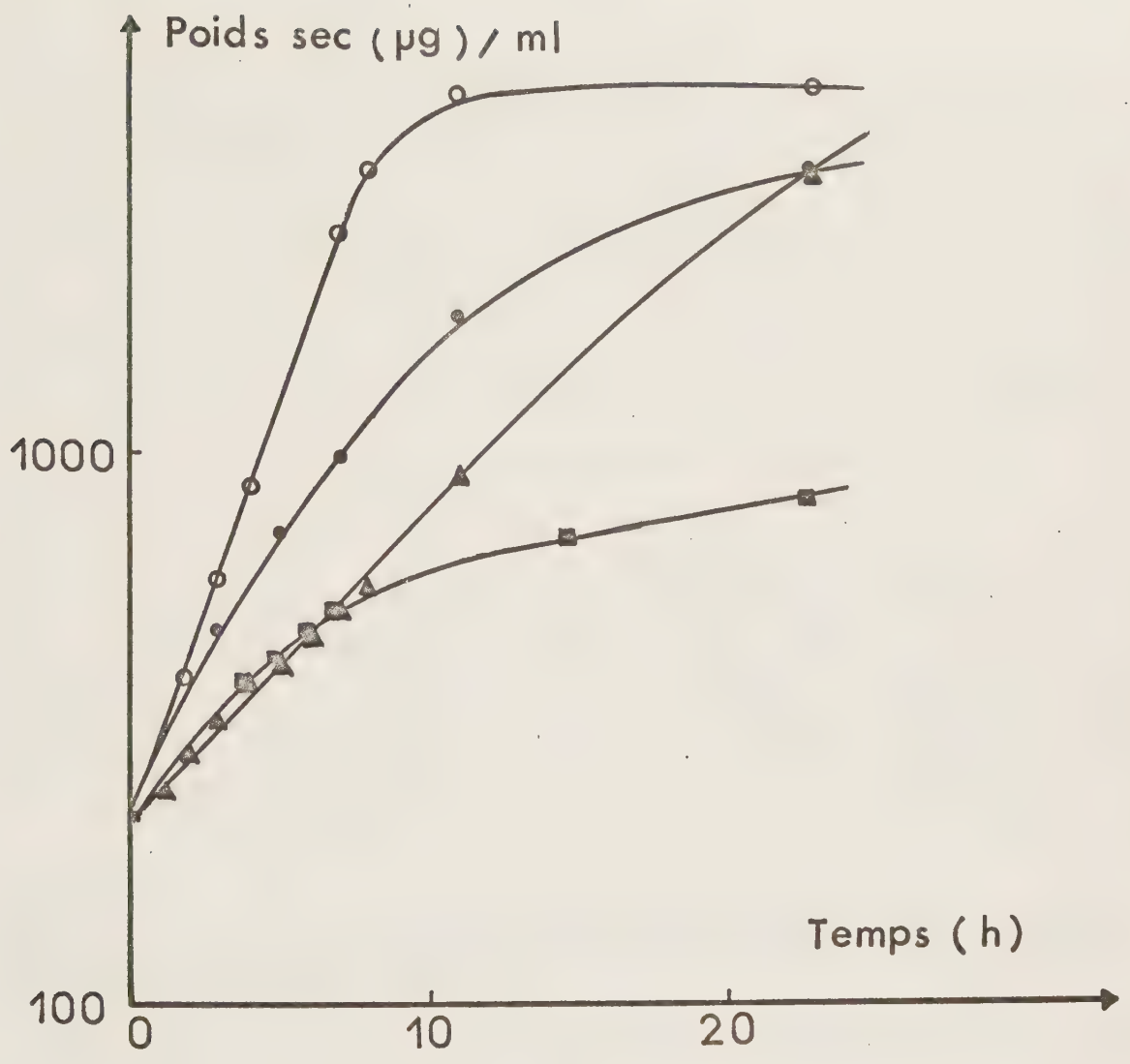


Fig.18. Effet du L-α-aminoadipate 5 mM sur la croissance de différentes souches lysine-.

Milieu F_1 lys 5.

- o souche 04-02 témoin (sans l-α-aminoadipate) ;
- • souche 04-02 ; ▼ souche 04-07 ;
- ▲ souche 01-102.

Les trois souches ayant des taux de croissance voisines sur milieu témoin, seule la courbe correspondant à la souche 04-02 a été tracée.

Souche	Gène muté	blocage métabolique	D sans αAA	D avec αAA	réduction
sauvage			4 300	1 200	72 %
01.102	lys 4	1	3 700	530	86 %
04.54	lys 4	1	4 400	1 200	73 %
04.38	lys 4	1	4 150	1 900	54 %
04.02	lys 2	2	4 600	3 300	28 %
04.05	lys 2	2	4 900	3 700	24 %
04.07	?	2	4 400	3 350	24 %
04.12	lys 9	2	2 900	1 900	34 %

Tableau IV

Effet du L-α-aminoadipate (αAA) sur la densité cellulaire (D) après 24 h pour différentes souches.

Milieu F_1 lys 5 ; sulfate d'ammonium 10 mM ; lysine chlorhydrate 5 mM ; éventuellement L-α-aminoadipate 5 mM.

Inoculation de 150 à 250 μg/ml.

Localisation du blocage métabolique : 1, en amont du L-α-aminoadipate
2, en aval du L-α-aminoadipate.

supérieur à la concentration intracellulaire sur milieu minimum, mais nettement inférieur à ce que nous considérons comme la concentration minimum de blocage, 500 à 600 µmoles/g (cf. Tableau II). Ce résultat va donc à l'encontre de notre hypothèse, mais la compartimentation intracellulaire accroît peut-être les différences réelles au niveau du site d'inhibition; il est en particulier concevable que la lysine endogène produite à partir du L- α-aminoadipate soit plus efficace que la lysine exogène, par suite d'un accès préférentiel au site de déclenchement de l' "effet lysine".

3.4. CONCLUSION ET DISCUSSION DU CHAPITRE III.-

Chez les levures incapables d'utiliser la lysine en tant que source d'azote, la persistance de cette lysine en fin de phase exponentielle, sur milieu à source azotée limitante, entraîne une inhibition de la croissance post-exponentielle.

Cette croissance post-exponentielle consiste d'ailleurs en un simple accroissement de la masse cellulaire sans division; la lysine bloque la croissance des bourgeons au moment précis où l'azote du milieu étant épuisé, le métabolisme cellulaire présente une réorientation dramatique.

Le passage d'une phase à l'autre s'accompagne en effet de remaniements enzymatiques spectaculaires. L'activité de certains enzymes décroît rapidement: c'est le cas de la NAD et la NADP glutamate-deshydrogénase (Beck et Von Meyenburg, I968); l'activité d'autres enzymes au contraire s'accroît fortement à ce moment : c'est le cas de l'arginase et l'ornithine-transaminase (Middelhoven, I968); ces variations des activités enzymatiques sont liées à d'intenses phénomènes de digestion sélective d'une part, de répression,

....

de dérepression et d'induction d'autre part (Matile, I969); en bref, il s'agit d'un véritable processus de différenciation biochimique (Mandelstam I960).

C'est dans le cadre de ces remaniements complexes accompagnant le passage de la phase exponentielle à la phase post-exponentielle, de la trophophase à l'idiophase (Demain I968) qu'agit la lysine. Observons toutefois qu'une inhibition de croissance se manifeste dès la phase exponentielle en présence de l' α -aminoadipate; ce métabolite intermédiaire agit sans doute en élevant précocement le taux de lysine dans un compartiment dans lequel est déclenché le phénomène régulateur responsable de l'effet observé.

La phase post-exponentielle serait seulement plus vulnérable, soit par suite du fait que le taux de lysine y franchit une barrière critique, soit par suite de la diminution d'un flux métabolique limitant, sensible à la lysine.

Pour préciser ces idées, il est nécessaire d'étudier les effets métaboliques de la l-lysine.

CHAPITRE IV - INFLUENCE DE LA LYSINE SUR LE METABOLISME DE L'ARGININE ET DE L'ORNITHINE.-

Le fait que l'action de la lysine ne soit sensible que lorsque l'azote limite le rendement suggérait de rechercher l'origine du phénomène dans le métabolisme azoté. Une étude des concentrations intra et extra-cellulaires des acides aminés libres a suggéré une première localisation du phénomène au niveau du métabolisme de l'arginine, ce qui nous a conduit à l'étude des effets de la lysine sur l'arginase et l'ornithine-transaminase.

4.I. ETUDE DE L'EVOLUTION DES CONCENTRATIONS INTRA ET EXTRA-CELLULAIRES DES ACIDES AMINES AU COURS DE LA CROISSANCE - (BOURGEOIS, I969).

Les tableaux V et VI présentent les résultats d'analyses effectuées sur des cultures obtenues en présence ou en absence de lysine, à divers stades de la croissance précisés sur la figure I9. Le tableau VII rapporte, d'autre part, les résultats d'une expérience destinée à étudier l'effet immédiat de l'addition de lysine à une culture sur milieu non supplémenté.

4.I.I. Globalement, la présence de lysine se traduit par une baisse de la concentration intracellulaire et une élévation de la concentration extracellulaire des acides aminés pendant la phase post-exponentielle.

4.I.2. L'évolution des concentrations individuelles des acides aminés les plus importants quantitativement dans la cellule et dans le milieu extérieur est encore plus significative.

4.I.2.1 - Sur milieu sans lysine

Les acides aminés qui ont la plus forte concentration intracellulaire, sont par ordre d'importance décroissante, l'arginine, l'alanine, l'acide glutamique, la lysine.

....

Stade de croissance	1		1 bis	2		3		6	
	témoin	+ lys.	témoin	témoin	+ lys.	témoin	+ lys.	témoin	+ lys.
Acide aspartique	4,1	5,3	6,5	4,6	6,8	8,9	5,2	4,9	3,3
Thréonine	3,3	2,9	5,4	4,1	5,4	4,0	3,3	2,1	1,5
Sérine	13,0	12,6	13,1	22,4	18,6	9,4	7,2	6,0	5,0
Acide glutamique	72,5	61,5	60,2	62,2	116,0	25,3	10,8	16,3	8,5
Proline	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycine	16,4	17,2	20,6	14,6	15,7	7,0	4,6	3,1	3,8
Alanine	190,0	107,0	102,0	4,7	28,2	4,9	5,0	2,3	3,4
Valine	18,7	13,1	14,5	3,0	9,9	2,1	6,0	0,9	1,6
Méthionine	2,9	3,0	2,1	0	0	0	0	0	0
Isoleucine	5,0	3,2	4,5	1,8	3,3	1,4	0,9	0,6	0,5
Leucine	5,2	2,5	5,0	1,2	2,8	1,3	1.1	4,6	0,8
Tyrosine	1,6	0,4	1,9	0,4	1,1	0,7	1,0	0,4	0,3
Phénylalanine	2,3	1,4	2,6	1,0	1,0	0,6	0,3	0,4	0,4
Lysine	36,9	420,0	20,2	48,0	620,0	39,1	100,0	10,5	142,0
Histidine	20,9	2,6	8,1	10,8	3,1	1,9	1.9	2,3	1,5
Arginine	286,0	19,2	90,0	156,0	10,4	0,6	3,2	3,3	4,5
Total partiel lysine exclue	641,9	251,9	336,5	286,8	222,3	68,1	50,5	47,2	35,1
Lysine/total p. 100	5,3 p. 100		5,7 p. 100	14,5 p. 100		36,5 p. 100		18,2 p. 100	

Tableau V (Bourgeois 1969).

Effet de la présence de lysine dans le milieu sur la concentration intracellulaire des acides aminés à différents stades de croissance (µmoles/g sec).

Concentration des constituants du milieu de culture : glucose 50 g/l ; sulfate d'ammonium 1 mM ; chlorhydrate de lysine, 10 mM.

Stade de croissance	1		3		4		5		7	
	témoin	lysine	témoin	lysine	témoin	lysine	témoin	lysine	témoin	lysine
Acide aspartique	0,3	0,8	0,4	1,2	0,2	2,0	0	0,8	1,0	1,7
Thréonine	0,8	2,3	0,4	2,0	0,2	2,1	0,1	1,3	0,3	2,0
Sérine	1,3	3,3	1,4	6,8	0,3	6,1	0,2	2,2	0,7	3,8
Acide glutamique	24,0	2,0	0	2,2	0	2,1	0,8	4,3	0,4	8,5
Proline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycine	1,1	1,2	1,2	0	0,4	10,8	0,5	8,2	4,0	9,0
Alanine	5,3	0,7	0,6	0	0	6,9	0,2	3,5	0	5,8
Valine	27,7	14,6	0	0,4	0	2,5	0	2,0	0,9	2,8
Méthionine	0	0	0	2,2	0	0	0	0	0	0
Isoleucine	0,2	0,7	0	8,0	0	0,6	0,4	2,7	11,6	3,2
Leucine	0,3	1,2	0	9,8	0	0,5	0	3,9	1,6	1,0
Tyrosine	0,3	1,7	0	8,1	0	8,2	0	7,7	0,7	10,4
Phénylalanine	7,4	3,1	0	0,4	0	3,0	0,8	2,0	27,5	1,4
Lysine			4,3		8,0		10,1		29,2	
Histidine	0,5	0,9	0	1,5	0		0,1		0,8	
Arginine	0,4	2,8	0	1,5	0	2,4	0	5,3	1,4	7,8
Total partiel (lysine et histidine exclues)	69,1	34,4	4,0	42,6	1,1	47,2	3,0	43,9	50,1	57,4

Tableau VI. (Bourgeois 1969).

Effet de la présence de lysine sur la concentration des acides aminés dans le milieu de culture à différents stades de croissance (µM).

Concentration des constituants du milieu de culture : glucose 50 g/l ; sulfate d'ammonium 1 mM ; chlorhydrate de lysine, 10 mM.

Culture	A		A'		B	
	C.I.	C.E.	C.I.	C.E.	C.I.	C.E.
Acide aspartique	4,1	0,3	2,8	0,2	5,3	0,8
Thréonine	3,3	0,8	5,9	0,3	2,9	2,3
Sérine	13,0	1,3	10,9	0,6	12,6	3,3
Acide glutamique	72,5	24,0	43,2	0,7	61,5	2,0
Proline	0	0	0	0	0	0
Glycine	16,4	1,1	13,6	2,0	17,2	1,2
Alanine	190,0	5,3	74,8	3,8	107,0	0,7
Valine	18,7	27;7	8,9	0,2	13,1	14,6
Méthionine	2,9	1,3	2,8	0	3,0	1,5
Isoleucine	5,0	0,2	1,0	0,1	3,2	0,7
Leucine	5,2	0,3	1,3	0,3	2,5	1,2
Tyrosine	1,6	0,3	1,1	0	0,4	1,7
Phénylalanine	2,3	7,4	1,1	0,6	1,4	3,1
Lysine	36,9		225,0		420,0	
Histidine	20,9	0,5	7,8		2,6	0,9
Arginine	286,0	0,4	132,0	0,5	19,2	2,8
Total partiel (lysine et histidine exclues)	621,0	70,4	299,4	9,3	250,3	35,0

– Tableau VII

Effet de l'addition de lysine en cours de croissance (en phase exponentielle), sur la concentration intra et extracellulaire des acides aminés.-(Bourgeois 1969).

Deux cultures A et B sont menées parallèlement sur milieu habituel (glucose : 50 g/l ; sulfate d'ammonium 1 mM); le milieu de culture B contient du chlorhydrate de L lysine 10 mM ; au stade de croissance 1 (cf fig.19) correspondant à 140 µg/ml, des aliquotes des deux cultures sont analysées ; le reste de la culture A, (culture A') est alors additionné de chlorhydrate de L-lysine 10 mM et après 30 min d'incubation dans les conditions habituelles est soumis également à l'analyse.
Les résultats des cultures A et B ont déjà été utilisés aux Tableaux I et II.
C.I. = concentration intracellulaire (µ moles/g sec).
C.E. = concentration extracellulaire (µM).

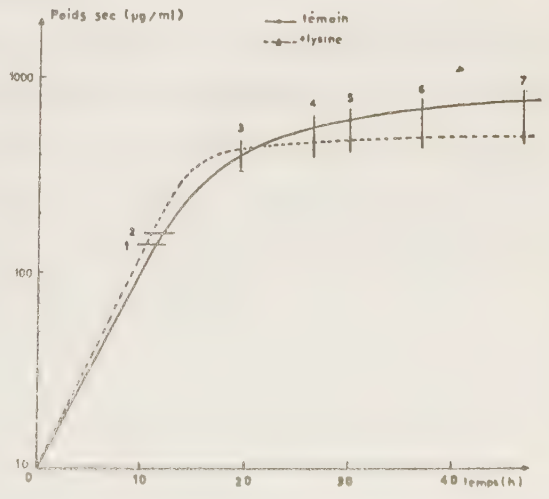


Fig.19.
Stades de croissance auxquels ont été effectués les analyses dont les résultats figurent aux tableaux I, II et III.(Bourgeois 1969).

- le taux d'arginine baisse brutalement en fin de phase exponentielle entre les stades 2 et 3 et tombe à une valeur de l'ordre du centième de sa valeur antérieure;

- le taux d'alanine subit également une baisse brutale, plus précoce que celle du taux d'arginine (entre les stades I et 2);

- les taux de glutamate et de lysine baissent progressivement au cours de la croissance post-exponentielle; par suite du caractère tardif de cette baisse, la lysine représente alors un pourcentage important des aminoacides intracellulaires (jusqu'à 36,5 %).

Du point de vue de l'excrétion, les faits les plus remarquables sont :

- l'important rejet de lysine corrélatif de la baisse progressive de sa concentration intracellulaire, qui montre que cette baisse n'est pas due à une dégradation, mais à une simple excrétion; aux stades 3,4,5 la lysine représente un pourcentage très important du total des acides aminés extracellulaires (respectivement 48 %, 88 %, 77 %).

- en ce qui concerne l'arginine au contraire, la chute de la concentration intracellulaire n'est nullement compensée par une élévation de la concentration extracellulaire; il n'y a donc pas excrétion, mais dégradation.

Une étude particulière de l'évolution des concentrations intracellulaires de lysine, au cours d'une croissance sur milieu minimum (figure 20), montre que le renversement des proportions arginine, lysine, coïncide avec le moment précis où cesse le bourgeonnement.

Remarque : La valeur élevée du taux de phényl-alanine au stade 7 est surprenante. Constatons cependant qu'elle coïncide avec un relèvement du taux d'autres acides aminés. A ce stade tardif de la croissance, cette élévation du taux d'azote extracellulaire résulte sans doute d'un phénomène nouveau, peut-être d'un début d'autolyse.

....

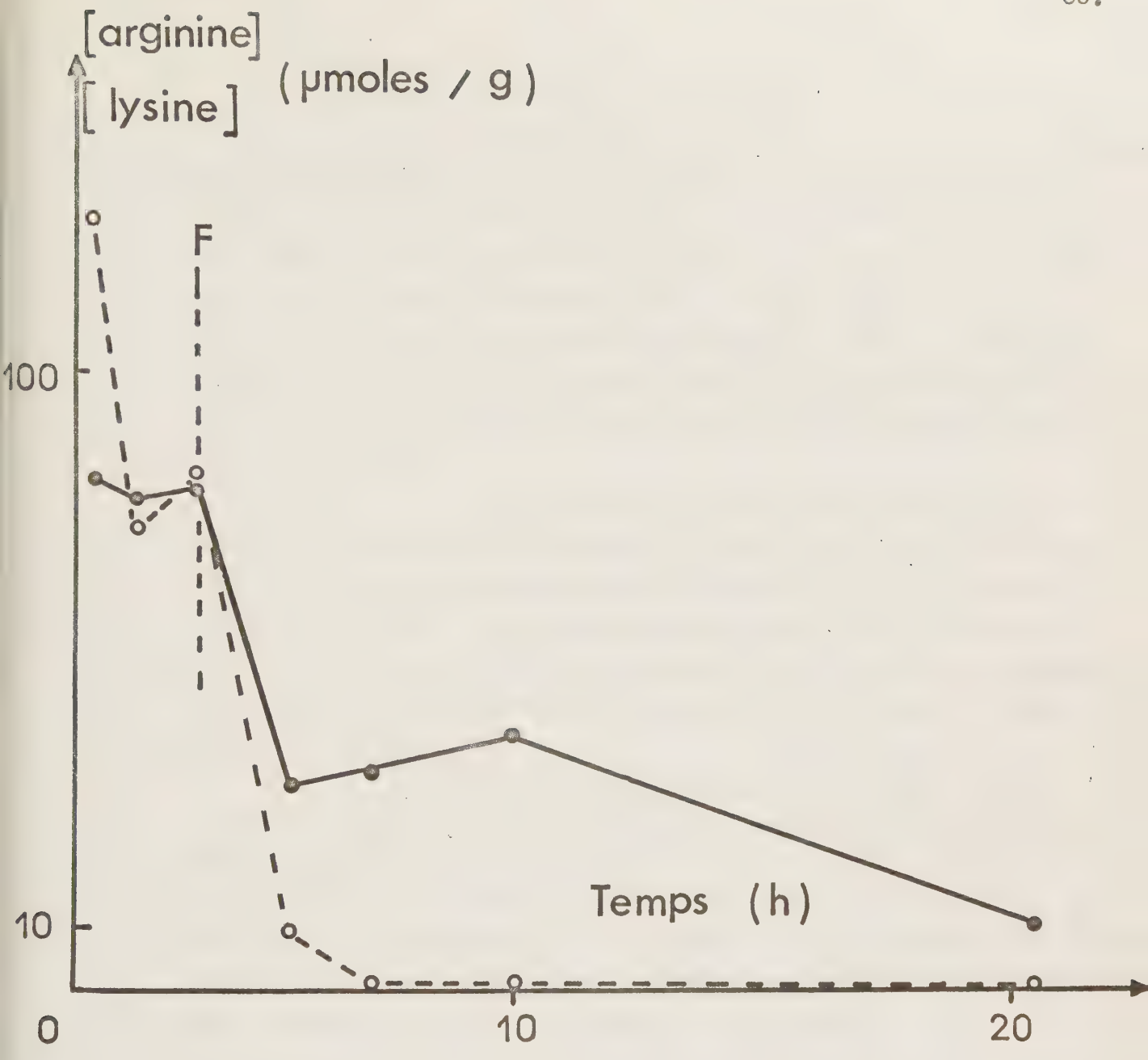


Fig. 20. Evolution des concentrations de lysine et d'arginine en fin de croissance.

lysine

arginine

F : fin de la phase exponentielle.

Culture sur F_3.

Ces analyses ont été effectuées à l'aide d'un analyseur Beckmann au laboratoire de chimie laitière de l'ENSAIA grâce à l'obligeance de Monsieur TARODO et de Madame NOVAC.

4.I.2.2. - Sur milieu additionné de lysine

En présence de lysine, le taux de l'arginine intracellulaire est très bas dès la phase exponentielle (stades I et 2), sans que le taux extracellulaire puisse rendre compte d'une exclusion. Un effet analogue quoique nettement moins marqué s'observe sur le taux d'histidine, alors que les taux des autres acides aminés ne sont pas modifiés sensiblement; la lysine, acide aminé basique abaisse donc spécifiquement les taux intracellulaires des autres acides aminés basiques.

Si la lysine est ajoutée en cours de culture, la baisse des concentrations d'histidine et d'arginine n'est pas instantanée (cf. Tableau VII); 30 minutes après l'addition, ces concentrations sont loin d'être aussi basses qu'après culture sur lysine, et pas plus que précédemment les concentrations extracellulaires ne rendent compte d'une exclusion.

Des modifications engendrées par la lysine la plus marquante est la diminution spectaculaire du taux d'arginine, non explicable par une simple excrétion, et donc d'origine métabolique; cette intervention de la lysine dans le métabolisme de l'arginine n'est peut-être pas sans rapport avec son effet sur la croissance, mais cette assertion nécessite d'être confirmée et précisée.

Remarque : La méthode d'analyse utilisée ne nous a pas permis de déterminer avec précision les concentrations d'ornithine, dont l'intérêt ne s'est d'ailleurs révèlé que plus-tard. Cependant, les résultats obtenus permettent, malgré leur imprécision, d'affirmer que la lysine entraîne une baisse modérée du taux d'ornithine qui, aux stades I et 2, passe d'environ 20 μmoles/g sec en l'absence de lysine à environ IO μ moles/g sec en sa présence.

...

4.2. ETUDE DES EFFETS DE LA LYSINE SUR L'ARGINASE ET L'ORNITHINE TRANSAMINASE.

Il s'agit maintenant de chercher l'origine de la baisse des taux d'arginine et d'ornithine mise en évidence, par une analyse des effets de la lysine sur leur métabolisme. Ramos et al. (I970) ont mis en évidence une action localisée en un point de la biosynthèse, à savoir une répression de l'ornithine transcarbamylase. Mais la carence en ornithine et arginine peut également résulter d'une intervention sur les enzymes cataboliques l'arginase et l'ornithine transaminase, dont Middelhoven (I968 , I970) a montré qu'elles sont normalement déréprimées à l'issue de la phase exponentielle.

4.2.I. Dérépression de l'arginase et de l'ornithine transaminase par la L-lysine (Bourgeois et Thouvenot, I970

Dans une première série d'expériences, l'effet de la présence de L-lysine 5 mM dans un milieu de culture au sulfate d'ammonium I0 mM (milieu F_1) a tout d'abord été étudié. La figure 2I qui matérialise les résultats obtenus au cours d'une de ces expériences, montre qu'en présence de lysine, les activités de l'arginase et de l'ornithine transaminase pendant la phase exponentielle sont respectivement 6 et I0 fois supérieures aux valeurs présentes dans les cultures sans lysine. Dans le cas de l'ornithine transaminase, l'activité spécifique atteinte (de l'ordre de 40 milliunités) est alors nettement supérieure à la valeur maximale atteinte habituellement au cours du jeûne ou de la carence azotée (environ I0 milliunités), mais la phase post-exponentielle ne s'accompagne alors d'aucune dérépression. Au contraire, dans le cas de l'arginase, on observe encore une importante dérépression au début de la phase post-exponentielle, dérépression qui porte l'activité de l'enzyme à son niveau maximal (400 à 500 milliunités).

L'addition de lysine 5 mM au cours d'une croissance sur un milieu au sulfate d'ammonium I0 mM, déclenche presque immédiatement, comme le montre la figure 22, une

...

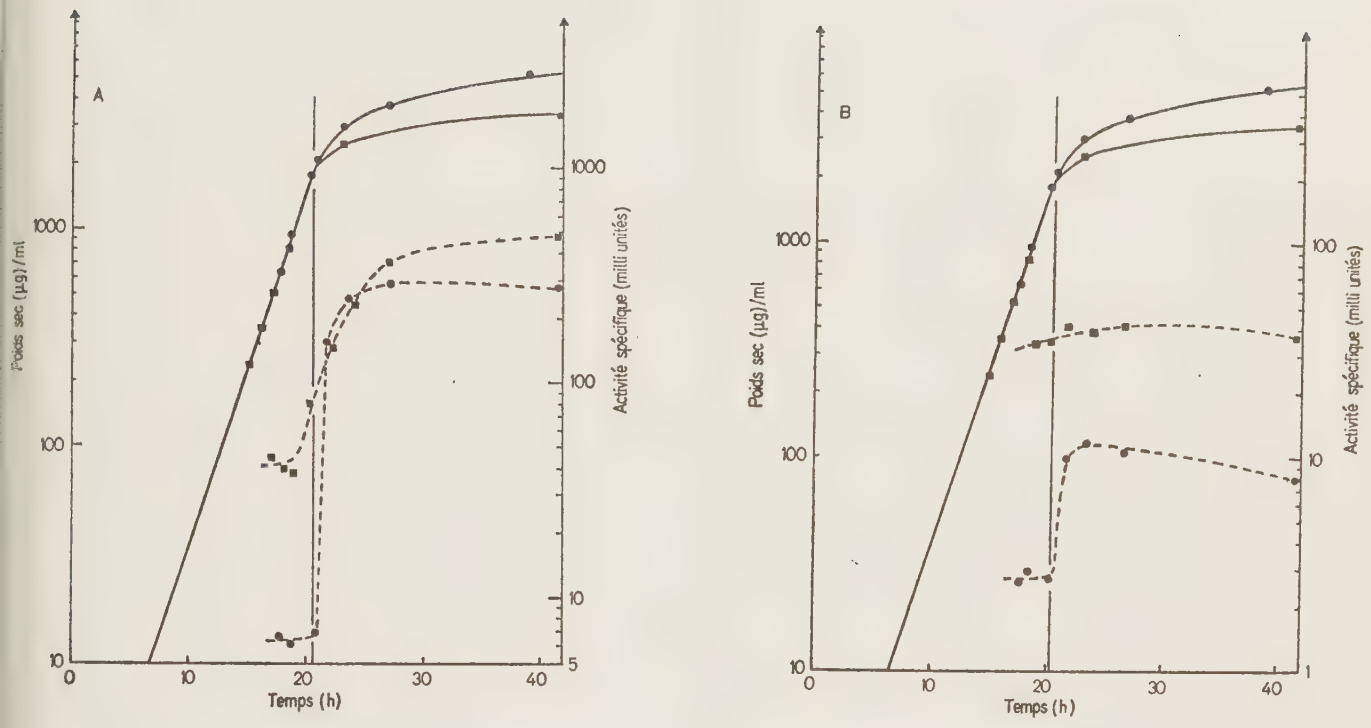


Fig.21. Effet de la présence de lysine dans le milieu de l'évolution de l'activité spécifique des deux enzymes au cours de la croissance (coordonnées semi-logarithmiques (Bourgeois et Thouvenot 1970).

(A) Arginase ; (B) Ornithine transaminase.

Le trait parallèle à l'axe des ordonnées marque la fin de la phase exponentielle.

——— poids sec ; - - - - - activité enzymatique ;

● témoin ; ■ + L-lysine 5 mM.

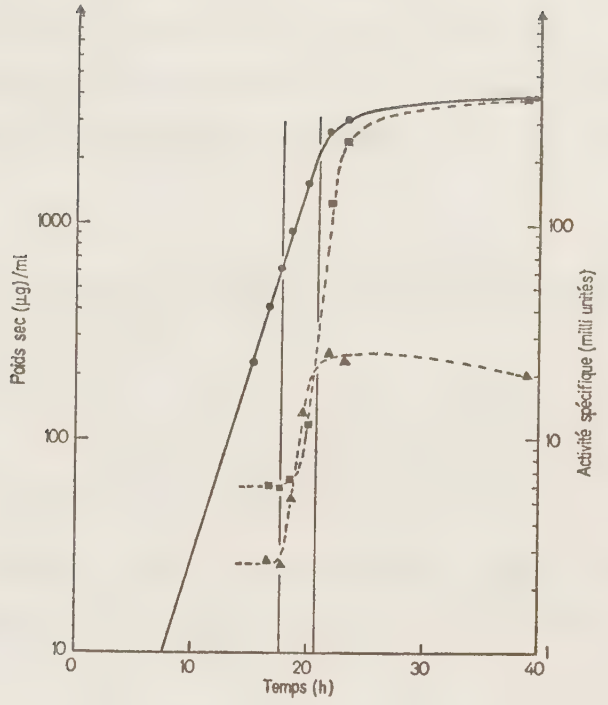


Fig.22. Dérépression de l'arginase et de l'ornithine transaminase par addition de lysine en cours de culture (Bourgeois et Thouvenot 1970). Coordonnées semi-logarithmiques. Milieu F_1.
Le moment de l'addition de L-lysine 5 mM et la fin de la phase exponentielle sont marqués par des traits parallèles à l'axe des ordonnées.
—●— poids sec ; - -■- - activité spécifique de l'arginase ;
—▲- - activité spécifique de l'ornithine transaminase.

importante élévation de l'activité des deux enzymes. L'effet de ce phénomène se fond ensuite avec l'élévation succédant normalement à l'arrêt de la croissance exponentielle, arrêt qui, dans nos conditions de culture, est lui-même lié à l'épuisement du sulfate d'ammonium exogène (cf. ci-dessus, paragraphe 3,2,I).

4.2.2. Inhibition de l'arginase par la L-lysine (Bourgeois et Thouvenot, I970).

L'étude a été menée à l'aide d'une préparation enzymatique débarrassée des substances diffusibles par passage sur une colonne de Séphadex (voir techniques).

Le Km de l'enzyme envers l'arginine a été déterminé (figure 23) sur le graphique $\frac{(S)}{v} = f(S)$ (Malher et Cordes , I966).

L'effet de la L-lysine sur la vitesse de réaction a ensuite été étudié pour une concentration en substrat voisine de la saturation (50 mM) et pour une concentration semi-saturante (5 mM). La figure 24 (Malher et Cordes, I966) permet de constater que la L-lysine exerce sur l'arginase une inhibition de type compétitif par rapport à l'arginine et de déterminer pour le Ki la valeur I,9 mM.

Avec l'ornithine transaminase, une étude moins complète que celle effectuée avec l'arginase a été réalisée; aucun effet inhibiteur de la lysine n'a pu être observé.

4.2.3. Etude de la dérepression post-exponentielle de mutants lysine.-

Le fait que la lysine exogène exerce une induction importante sur l'arginase et l'ornithine transaminase, joint au fait que, lors d'une culture sur milieu minimum la lysine représente en phase post-exponentielle l'acide aminé dominant du pool, nous avait suggéré la possibilité que cette lysine endogène intervienne de façon causale dans

....

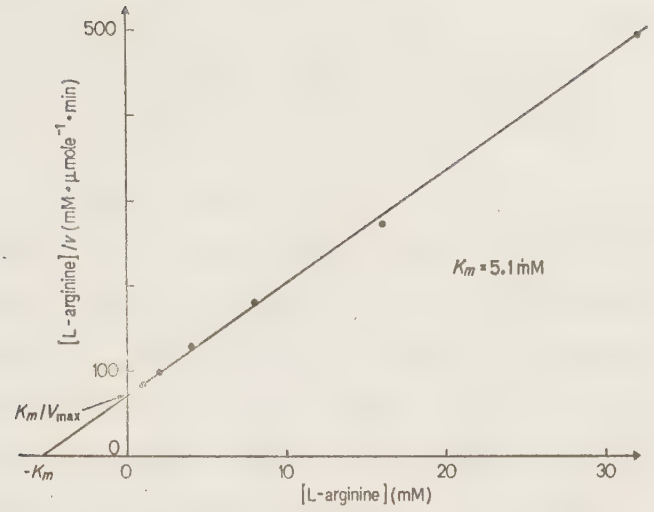


Fig.23. Variation de l'activité de l'arginase en fonction de la concentration en substrat.(Bourgeois et Thouvenot 1970).
Représentation $[S]/v = f[S]$.

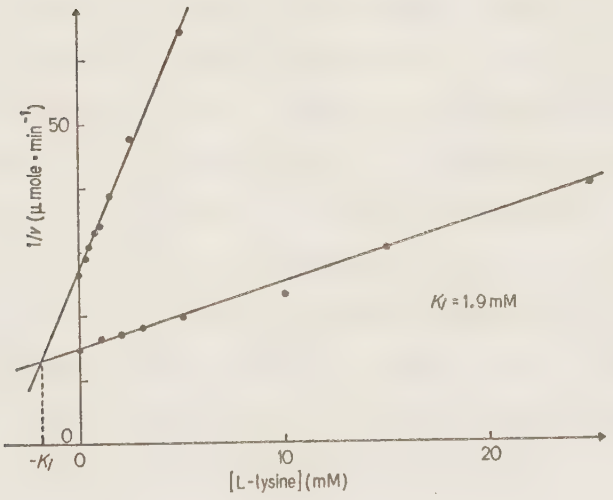


Fig.24. Variation de l'activité de l'arginase en fonction de la concentration en L-lysine et détermination graphique du K_i sur une représentation $1/v = f[I]$(Bourgeois et Thouvenot 1970).
L'étude de la variation de v en fonction de I a été effectuée pour deux valeurs de $[S]$ voisines respectivement de la concentration de saturation, 50 mM (droite inférieure) et de la concentration correspondant à la valeur de K_m, 5 mM (droite supérieure).

l'accroissement post-exponentiel de l'activité de ces enzymes, qui a été mis en évidence par Middelhoven (I968) et interprèté récemment comme résultantde la levée d'une répression catabolique azotée (Middelhoven, I970, Wiame I97I).

D'où l'idée d'étudier la dérepression de ces enzymes chez des mutants lysine- cultivés sur une concentration en lysine assez faible pour limiter le rendement. Pour une concentration en $(NH_4)_2\ SO_4$ 5 mM, la lysine limite le rendement en-dessous de 0,8 mM. La figure 25 permet de comparer les activités des deux enzymes en phase post-exponentielle, lors de cultures sur lysine à faible concentration (0,6 mM pour $(NH_4)_2\ SO_4$ I0 mM) et en présence d'un excès de lysine (5 mM pour $(NH_4)_2\ SO_4$ I0 mM). Il apparaît immédiatement que les activités atteintes sont beaucoup plus faibles quand la croissance s'arrête par suite d'une carence en lysine que quand la lysine est en excès; les rapports des valeurs atteintes sont très variables, la moyenne se situant autour de 6 pour l'arginase (contre 1 à 2 chez la souche sauvage), autour de 5 pour l'ornithine transaminase (contre 4 chez la souche sauvage); l'effet de carence est donc surtout sensible pour l'arginase. Remarquons d'ailleurs que, même en présence de lysine 5 mM, l'activité maximale atteinte par l'arginase est plus faible chez les mutants que chez la souche sauvage.

Enfin le cas du mutant OI-I02 (lys 4) est particulier; il ne manifeste pratiquement pas de dérepression de l'arginase même en présence de lysine 5 mM. Il a fait l'objet d'une étude approfondie ainsi qu'un autre lys 4, de comportement normal celui-là, le 04-54.

4.2.3.I. - Etude du mutant 04-54.

Une première expérience a montré que, lors d'une culture de ce mutant en présence de lysine 5 mM, l'évolution de l'activité de l'arginase et de l'ornithine-transaminase est analogue à celle observée chez la souche sauvage dans les mêmes conditions (pour l'arginase, 25 m U I en phase exponentielle et 330 m U I en phase post-exponentielle).

....

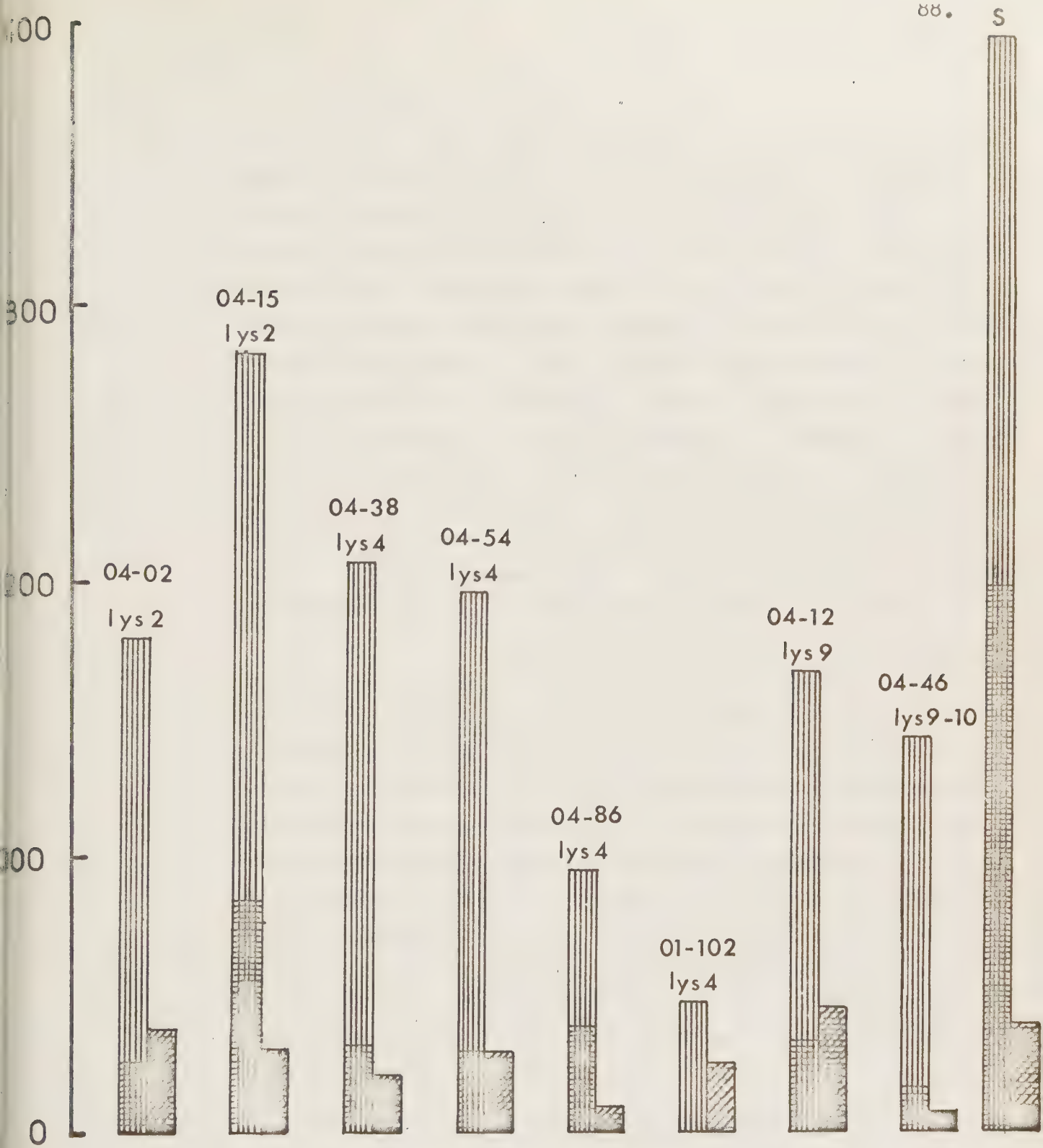


Fig.25. Activités spécifiques de l'arginase et de l'ornithine transaminase de mutants lys- cultivées sur diverses concentrations de L-lysine.

▥ arginase - l-lysine 5 mM ;

▨ ornithine transaminase - l-lysine 5 mM ;

▦ arginase - l-lysine 0,6 mM ;

▩ ornithine-transaminase - l-lysine 0,6 mM.

Les analyses ont été effectuées sur ces cellules récoltées 5 à 20 h après la phase exponentielle. La souche 01-102 n'a pas été étudiée en présence de L-lysine 0,6 mM.

S : souche sauvage.

Une expérience de transfert a ensuite été réalisée dans les conditions suivantes : une expérience préliminaire ayant permis de préciser que sur milieu contenant du sulfate d'ammonium 5 mM, la lysine cesse d'être limitante entre 0,8 et 1 mM, le mutant a été cultivé sur un milieu à lysine limitante; les cellules ont été récoltées en fin de phase exponentielle, c'est-à-dire au moment où le pool de lysine s'épuise, et transférées après lavage sur divers milieux. L'examen du tableau VIII fait apparaître une divergence entre les comportements de l'arginase et de l'ornithine-transaminase, qui recoupe d'ailleurs des observations antérieures d'autres auteurs : (Middelhoven I970, Wiame I97I) et de nous-mêmes (paragraphe 4.2.I et Bourgeois et Thouvenot I970).

Cette différence de comportement suggère l'idée d'une induction séquentielle, le produit de l'activité de l'arginase, l'ornithine induisant l'ornithine-transaminase. Mais cette idée est infirmée par une expérience de Thuriaux (I969) et par les résultats expérimentaux rapportés au tableau IX : l'ornithine a sur l'ornithine-transaminase un effet inducteur inférieur à celui de l'arginine et de la lysine; les effets de l'arginine et de l'ornithine sur cet enzyme semblent plus ou moins cumulatifs; les comportements des deux mutants arginase-déficients sont très différents, ce qui traduit vraisemblablement une différence de nature des mutations en cause qui reste à préciser.

4.2.3.2. Etude du mutant OI-I02.

Même lorsqu'il est cultivé en présence d'une concentration excédentaire de lysine, ce mutant conserve une activité ornithine-transaminasique inférieure à la normale et surtout son activité arginasique ne présente pratiquement pas de dérepression post exponentielle (figure 26).

Dans le but de savoir si cette souche était fondamentalement incapable de développer une

....

Milieu de transfert		arginase (m.U.I.)	ornithine-transaminase (mU.I)
F_1 sans source d'N		202	15,2
F_1 complet		75	14,6
F_1 lys_5 sans NH_4^+		600	43,7
F_1 arg_5 sans NH_4^+		522	61,3
Récapitulation pour comparaison des activités obtenues lors de cultures sur	F_1 phase expo	6 - 7	2 - 3
	F_1 phase post expo	200 - 300	8 - 12
	F_1L_5 phase expo	35 - 45	30 - 35
	F_1L_5 phase post expo	300 - 500	35 - 40

Tableau VIII.

Essai de dérepression de l'arginase et l'ornithine-transaminase par transfert sur différents milieux.

Souche lys-54 cultivée sur F_1 L 0,8 et transférée en fin de phase exponentielle ; le broyage des cellules est effectué 24 h après transfert.

m.U.I. : milliunités internationales = nmoles/min.mg.

---

ilieu / che	F_3		F_3 arg 2,5		F_3 orn_5		F_3 lys_5	
	poids sec µ g/ml	act.sp.	poids sec µg/ml	act. sp.	poids sec µg/ml	act.sp.	poids sec µ g/ml	act.sp.
uvage	3.175	9,0	4.785	72,8	4.775	13,2	2.520	47,4
-25	2.885	21,1	2.155	34,6	4.470	33,8	2.225	28,0
-31	2.725	16,4	2.190	25,6	4.570	11,1	2.190	17,9

oleau IX. Expérience destinée à tester le caractère séquentiel de l'induction de l'ornithine-transaminase.

Culture sur F_3 complémenté.

Récolte 6 h après la fin de la phase exponentielle.

Les souches 02-25 et 02-31 sont arginase déficientes.

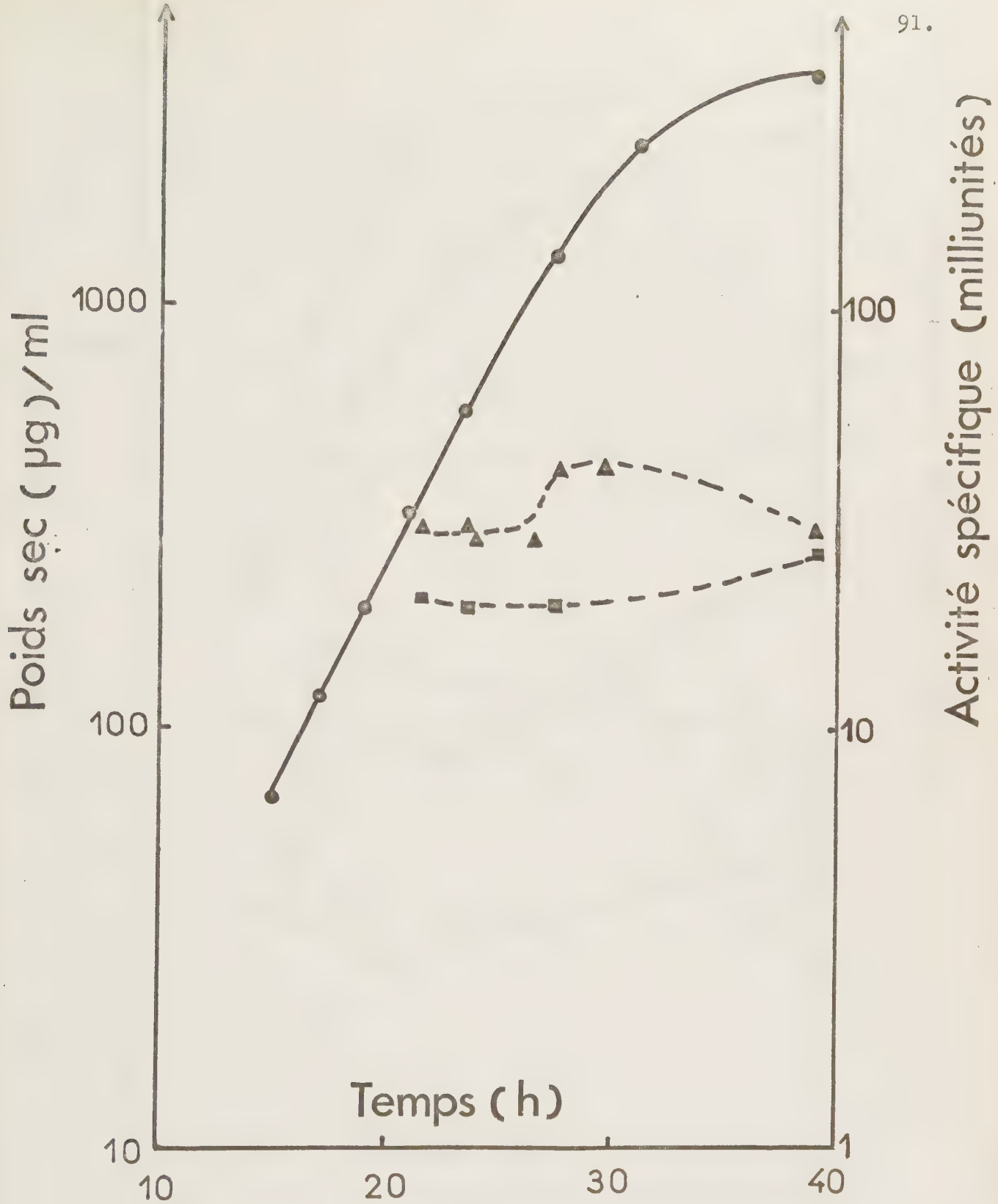


Fig.26. Evolution des activités de l'arginase et l'ornithine-transaminase au cours de la croissance chez le mutant 01-102.

Milieu F_1 lys_5.

—●— croissance ;

– –▲– – arginase ;

– –■– – ornithine-transaminase.

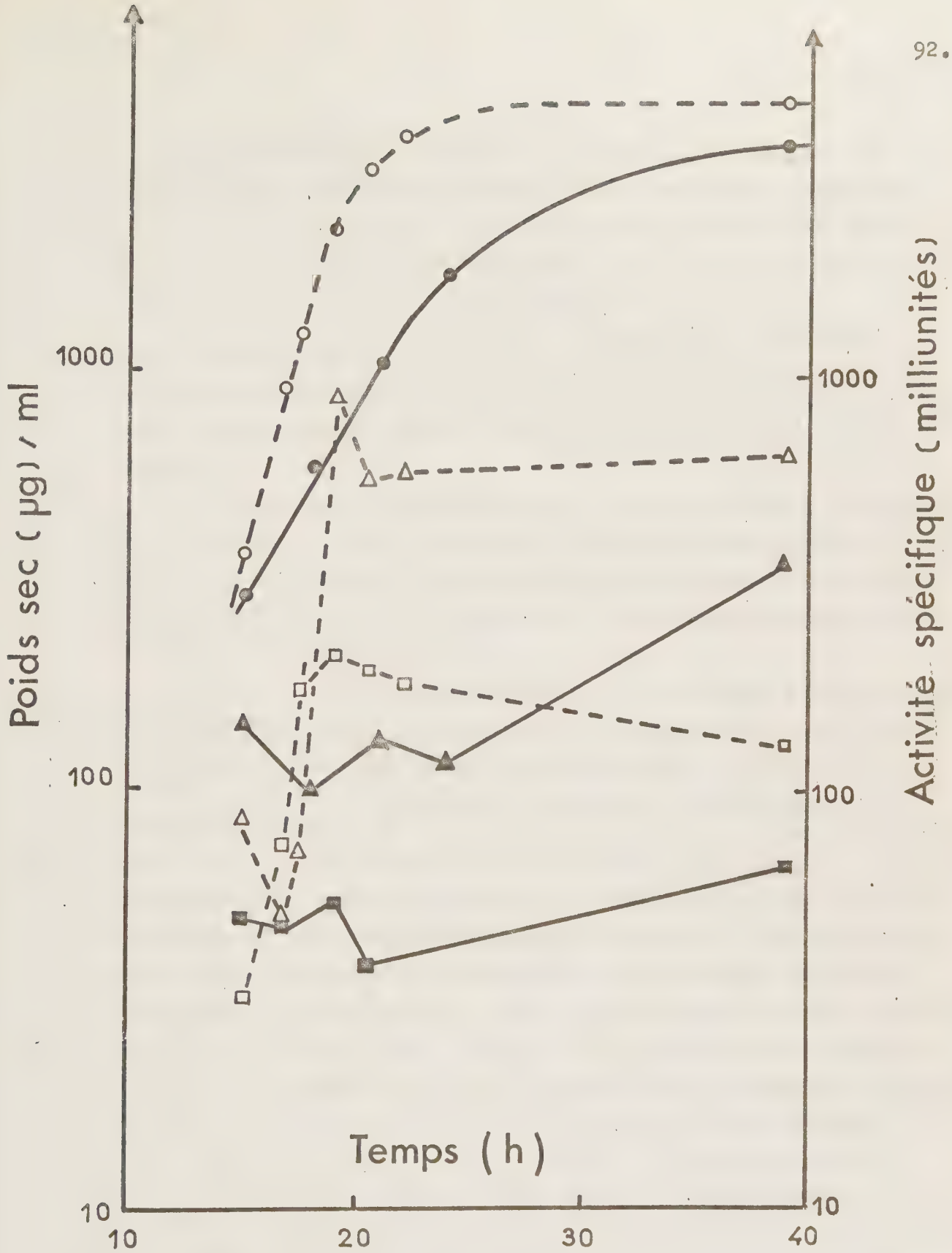


Fig.27. Evolutions comparées des activités de l'arginase et de l'ornithine transaminase chez la souche sauvage et la souche 01-102.

●-▲-■ souche 01-102 ; -○-△-□- - - souche sauvage.

○ ● croissance ; △ ▲ activité spécifique de l'arginase.

□ ■ activité spécifique de l'ornithine-transaminase.

Milieu F_1 à source d'azote modifiée : $(NH_4)_2 SO_4$ 5 mM ; L-arginine 2,5 mM ; L-lysine 5 mM.

activité arginasique élevée ou si seul le mécanisme de la dérepression post-exponentielle était perturbé, nous avons suivi les activités de l'arginase et de l'ornithine transaminase de la souche, parallèlement à celles de la souche sauvage, sur deux milieux particuliers :

- sur milieu dépourvu de $(NH_4)_2\ SO_4$ et contenant comme source d'azote l'arginine 5 mM et la lysine 5 mM, l'activité de l'arginase est élevée uniformément pendant toute la croissance (500 à 800 m U I) et ceci pour les deux souches.

- sur milieu contenant à la fois du sulfate d'ammonium, de l'arginine et de la lysine, l'évolution des activités (figure 27) confirme le comportement très particulier de cette souche caractérisée en particulier par une dérepression post-exponentielle très lente.

Ces constatations nous ont conduit à rechercher la différence existant entre cette souche OI-I02 et l'autre souche lys 4 (04-54) étudiée précédemment. Cette souche OI-I02 présente un temps de latence anormalement long au repiquage, surtout si la culture de stock est assez ancienne (de l'ordre de 24 h pour une culture de stock âgée de 2 mois); ce retard à la croissance pourrait être lié à la difficulté constatée de synthétiser les enzymes induits. Ces particularités sont vraisemblablement liées à une seconde mutation. L'analogie de comportement avec les mutations "relax" d'E.coli (Stent et Brenner I96I, Javor et all. I969) nous a suggéré de tester la biosynthèse des RNA lors d'une carence en lysine: la vitesse d'incorporation du ^{14}C uracile tombe beaucoup plus rapidement chez la souche OI-I02 que chez la souche 04-54 (figure 28); entre 30 min. et 2 h 30 après transfert le taux d'incorporation est pour le 04-54 de I5 à 20 n moles/g sec. min. contre 80 à I00 au cours d'une croissance exponentielle; au contraire chez le OI-I02 le taux d'incorporation s'annule I h 30 à 2 h. après transfert. Ce n'est pas le résultat escompté, mais cette particularité explique peut-être cependant le comportement particulier du OI-I02.

Remarque.- 1) Cette souche OI-I02 est d'ailleurs la seule souche mutante que nous ayions isolée lors d'une expérience

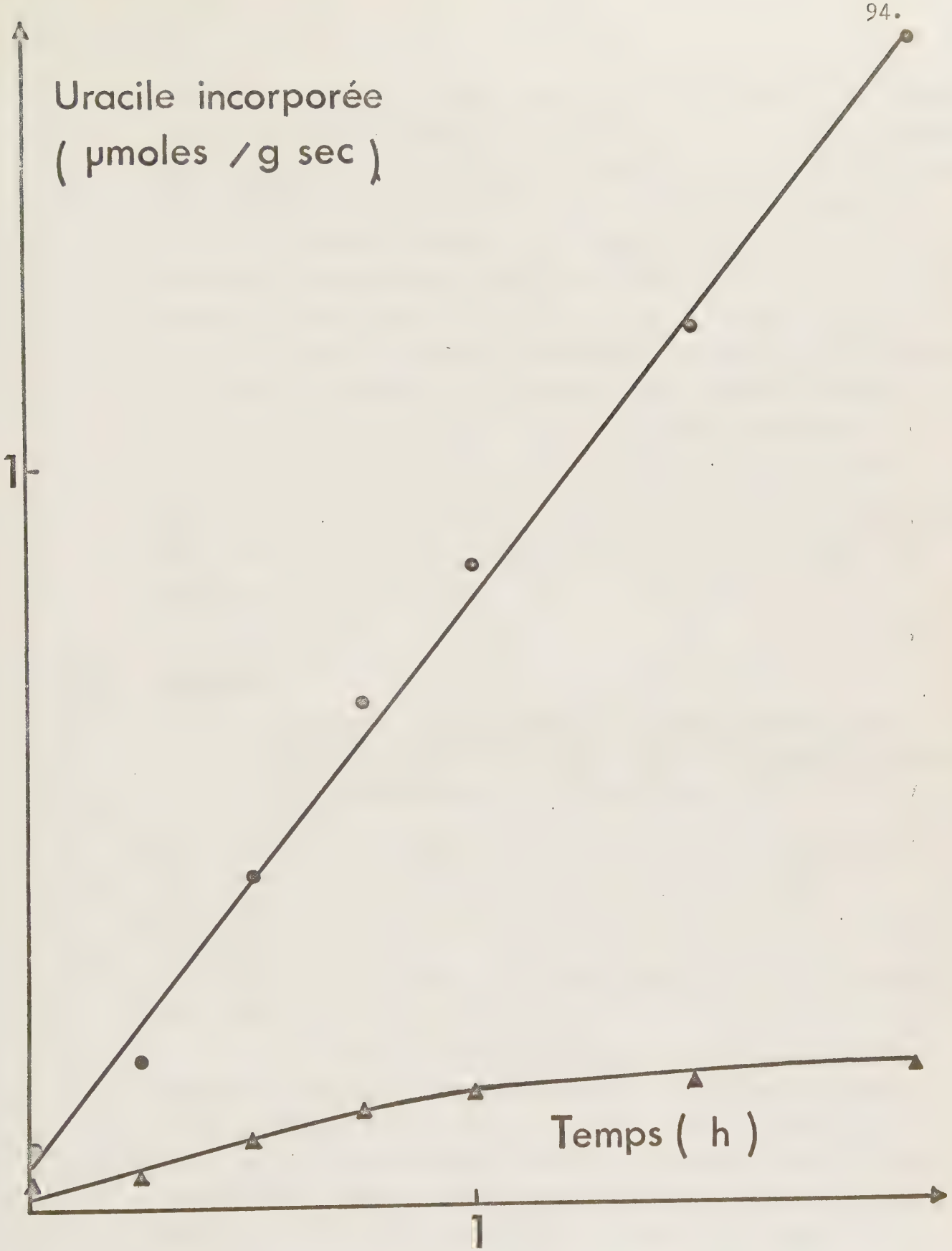


Fig.28. Incorporation de la ^{14}C-uracile par les souches 54 et 102 au cours de la carence en lysine.

● souche 54 ; ▲ souche 102.

Milieu W_3 ; inoculation à 200 µg/ml par de la levure exponentielle ; addition d'uracile marquée 5 mM 30 min après transfert sur le milieu W_3.

de mise au point de notre technique d'isolement à la nystatine : il est vraisemblable qu'à ce stade où notre technique de sélection était encore mal réglée, ce mutant ait résisté à la nystatine grâce à son temps de latence anormal.

2) Croyant d'abord que l'anomalie de ce mutant était de nature perméasique, nous avons essayé de déreprimer les enzymes par addition au milieu de l'- α - aminoadipate qui rentre par un système différent de celui de la lysine. Un intense freinage de croissance a été obtenu (chapître 3) en l'absence de tout effet inducteur sur l'arginase et l'ornithine-transaminase. Ce résultat met en cause soit l'analogie de l'effet α-aminoadipate avec l'effet lysine, soit plus vraisemblablement la relation de cause à effet entre l'induction enzymatique engendrée par la lysine et le blocage de croissance.

4.3. DISCUSSION.

4.3.I. - La culture en présence de lysine introduit des perturbations importantes dans les concentrations des aminoacides, et en particulier :

- une élévation en phase post exponentielle de la concentration extracellulaire des aminoacides, qui semble en relation avec une legère baisse de la concentration intracellulaire globale.
- une baisse plus précoce et très marquée de la concentration intracellulaire d'arginine.

Au premier phénomène, divers travaux antérieurs suggèrent l'explication d'une action sur la perméation; selon Surdin et all. (I965), un acide aminé ajouté au milieu peut chasser partiellement les acides aminés extracellulaires; d'autre part, Grenson et all. (I966) ont montré que l'une des perméases assurant le transport de la lysine est peu spécifique, ce qui permet d'expliquer les faits constatés, par une inhibition de la réabsorption des aminoacides excrétés. Remarquons cependant que l'azote de

.....

aminoacides excrétés ne représente que 50 µ équivalents environ sur 2 000 introduits dans le milieu sous forme de sulfate d'ammonium; cette perte de 2,5 % de l'azote assimilable provoquée par la lysine n'est pas suffisante pour expliquer l'importante baisse du rendement de la croissance (au moins 30 % sans tenir compte de l'assimilation de lysine).

Le second phénomène est plus intéressant; le taux d'arginine qui est très important en fin de phase exponentielle dans les conditions habituelles (I00 à 300 µ moles/g) avant de s'effondrer brutalement, est environ 20 fois plus faible en présence de lysine. Il est tentant d'expliquer encore ce fait par un effet de perméabilité, comme le suggèrent certaines données bibliographiques et, en particulier, le fait que la croissance d'un mutant arg- de Neurospora est inhibée par la présence de lysine qui empêche l'entrée de l'arginine (Cybis et Weglenski, I969).

Mais la faible concentration intracellulaire n'est nullement compensée par la concentration extracellulaire; les faits constatés ne s'expliquent donc pas par une excrétion, mais par une synthèse réduite ou une dégradation accrue en présence de lysine : l'effet essentiel de la L-lysine n'est donc pas de nature perméasique, mais métabolique.

4.3.2. <u>Les résultats relatifs aux effets régulateurs exercés par la lysine sur l'arginase et l'ornithine-transaminase s'intégrent bien dans la conception actuelle de la régulation d'ensemble du métabolisme de l'arginine et de l'ornithine</u>.

L'effondrement brutal du pool d'arginine, en fin de phase exponentielle sur milieu minimum, que nous avons mis en évidence, est vraisemblablement dû à la dérepression de l'arginase et de l'ornithine transaminase découverte par Middelhoven (I968).

En revanche, la faiblesse du pool d'arginine dès la phase exponentielle en présence de lysine, ne s'expliquait

...

pas de façon aussi évidente : il pouvait être la conséquence d'un effet négatif sur la biosynthèse, par exemple de l'effet represseur sur l'ornithine-transcarbamylase mis en évidence par Ramos et al. (I970), ou d'un éventuel effet positif sur la dégradation.

Nous avons effectivement montré que la présence de lysine dans le milieu de culture accroît considérablement les activités de l'arginase et de l'ornithine transaminase et modifie l'évolution de ces activités au cours de la croissance; en outre, la lysine exerce une inhibition compétitive sur le premier de ces enzymes. Elle a donc des effets analogues à ceux attribués à l'ornithine par Middelhoven. D'ailleurs, une telle inhibition de l'arginase par la lysine a été mise en évidence antérieurement chez d'autres organismes (Hunter et Downs, I945).

L'induction des enzymes cataboliques de l'arginine par la lysine que nous avons mise en évidence, après l'observation de son effet represseur sur les enzymes anaboliques par Ramos et al. (I970), est en accord avec la découverte par Thuriaux et al. (I968) d'un élément génétique régulateur commun à l'anabolisme et au catabolisme de l'arginine chez S. cerevisiae. L'action de la lysine sur le produit de cet élément génétique, s'explique sans doute par son analogie chimique avec l'ornithine; d'ailleurs un effet analogue de la lysine sur la régulation du métabolisme de l'arginine a été signalé récemment chez Aspergillus nidulans, par Cybis et Weglenski (I969); l'intérêt biologique éventuel de cette conséquence d'une analogie chimique sera discuté ultérieurement.

4.3.3. Les résultats acquis apportent d'autre part quelques éléments nouveaux à l'explication de la régulation particulière du catabolisme de l'arginine.-

Le fait que l'ornithine comme l'arginine sont capables d'induire les deux enzymes, pose le problème des

....

rapports entre leurs synthèses respectives. La constatation par Middelhoven (I970) d'un effet répresseur plus marqué de certains composés azotés sur l'ornithine-transaminase que sur l'arginase, suggère que les synthèses ne sont pas coordonnées. Thuriaux (I969) discute, d'autre part, l'éventualité d'une induction séquentielle : le fait qu'en présence d'ornithine, le taux d'arginine intracellulaire soit très bas chez la souche sauvage, confirme que l'ornithine elle-même est inductrice, mais d'autre part, la souche car A, déficiente en arginase, induit normalement la transaminase en croissance sur arginine, ce qui montre que l'induction de la voie catabolique n'est pas séquentielle.

L'étude de l'évolution des activités en cours de croissance (paragraphe 4,2,1), aussi bien que les expériences de transfert (paragraphe 4,2,3,1) confirment l'absence de parallélisme entre les évolutions des deux activités enzymatiques et la sensibilité très différente de leur taux de synthèse à la présence des ions NH_4^+ . L'absence d'induction séquentielle constatée par Thuriaux (I969) et confirmée par nous-mêmes, ayant permis d'écarter une première explication de cette différence de comportement, la distinction très nette faite par Wiame (I97I) entre deux systèmes de régulation est venue à point pour permettre une tentative d'explication : les deux régulations en cause, à savoir l'induction par l'arginine, l'ornithine ou la lysine et la répression catabolique azotée (voir paragraphe I,3,2) ont vraisemblablement une importance très inégale pour les deux enzymes; l'arginase est soumise d'une part à une induction de la part de la lysine par exemple (amplitude I à 8 en phase exponentielle, c'est-à-dire sur enzyme reprimé, I à 2 en phase post-exponentielle, c'est-à-dire sur enzyme déréprimé), d'autre part à une répression catabolique azotée (amplitude de 50 à I); dans le cas de l'ornithine transaminase l'induction est du même ordre (I à I0 en phase exponentielle, I à 3 en phase post-exponentielle), mais la répression

...

catabolique azotée est beaucoup moins intense (4 à I) et elle est inapparente en présence de lysine. Il est remarquable que cette sensibilité moindre de l'ornithine transaminase à la répression catabolique azotée coïncide selon Wiame (communication personnelle) avec une sensibilité plus élevée à la répression catabolique carbonée.

4.3.4. L'étude du comportement des enzymes des mutants lys-est difficile à interpréter.-

Cette étude était destinée à rechercher un éventuel rôle de la lysine dans la dérepression post-exponentielle, mais lors de la parution de la publication de Wiame (I97I), une analyse plus approfondie des résultats acquis à la lueur de la distinction proposée entre induction et répression catabolique, a montré que la lysine jouait un rôle inducteur, mais n'a fourni aucune indication d'un éventuel rôle dans la dérepression catabolique, ce qui limite l'intérêt du travail effectué sur les mutants lys-.

Nos résultats établissent toutefois que ces mutants ne développent que des activités arginasiques faibles, surtout si la lysine est limitante; au contraire, l'activité ornithine-transaminasique n'est guère modifiée. L'activité affectée est donc celle qui subit la dérepression catabolique la plus intense, mettant en jeu la synthèse protéïque la plus importante; il est donc possible que le phénomène ne soit pas spécifique, mais résulte simplement de l'effet de la carence en un aminoacide sur la biosynthèse protéïque, hypothèse qui n'a toutefois pas été testée.

Le comportement du mutant OI-I02 est aberrant, mais sa dérepression très lente ne semble pas spécifique elle non plus; elle est vraisemblablement liée à une anomalie de la régulation générale de la biosynthèse des RNA et des protéines, surajoutée à l'auxotrophie.

Alors que chez le mutant 04-54, le taux d'incorporation de ^{14}C-uracile pendant la carence en lysine reste

...

égal à environ 20 % du taux maximum, ce qui est en bon accord avec les données bibliographiques (30 % chez E. coli selon Lazzarini et Dahlberg, 1971), chez le 01-102 au contraire l'incorporation cesse rapidement. Puisque la carence en aminoacides touche essentiellement les formes stables de RNA, l'anomalie du mutant 01_102 pourrait donc concerner la régulation de la biosynthèse ou de la dégradation des ARNm par un contrôle différent du système rel-str, par exemple par celui mis en évidence par Stubbs et Stubbs (1970).

CHAPITRE V - RECHERCHE SYSTEMATIQUE DE L'ORIGINE DE L'EFFET DE LA LYSINE SUR LA CROISSANCE, PAR ISOLEMENT ET ANALYSE DE DIFFERENTS MUTANTS.-

A l'issue des expériences précédentes, il est nécessaire de déterminer si les interventions dans le métabolisme de l'arginine et plus particulièrement l'induction de l'arginase et l'ornithine transaminase, sont réellement responsables de l'inhibition de croissance et, dans le cas contraire, d'en rechercher les causes véritables.

5.I. LOCALISATION DE L'ORIGINE DE L'INHIBITION DANS LE METABOLISME DE L'ARGININE.-

Si la cause du phénomène observé consiste en une carence en arginine ou en ornithine, ces substances doivent pouvoir antagoniser l'effet lysine.

L'arginine et surtout l'ornithine exercent effectivement chez la souche sauvage une certaine protection. Mais étant donné les interconversions possibles entre ornithine et arginine, il est nécessaire de déterminer si chaque produit indépendamment est efficace ou si l'un d'eux n'est efficace que par suite de sa conversion en l'autre; pour cela il est commode d'utiliser :

- un mutant incapable de transformer l'ornithine en arginine, par exemple le mutant 03-09 (arg , bloqué entre citrulline et arginine)
- un mutant incapable de transformer l'arginine en ornithine, par exemple le mutant 02-25 (arginase-déficient).

Sur le mutant 03-09, les effets protecteurs sont limités et les résultats ambigus par suite de son auxotrophie ; d'une part, il est impossible de le cultiver sur ornithine seule; d'autre part, puisque l'arginine se transforme en ornithine sous l'action de l'arginase, il est possible qu'elle devienne limitante en fin de croissance.

....

Le mutant 02-25, qui est prototrophe, donne des résultats beaucoup plus clairs (figure 29) : l'ornithine le protège efficacement contre l'effet lysine, tandis que l'arginine réduit le rendement à sa valeur en présence de lysine, que celle-ci soit présente ou non.

C'est donc la carence en ornithine plutôt que celle en arginine qui est responsable de l'effet observé.

5.2. EXCLUSION DE L'EFFET SUR LE CATABOLISME EN TANT QUE CAUSE DE L'INHIBITION.-

L'expérience précédente montre que le mutant 02-25, arginase déficient, mais à activité ornithine transaminasique normale, reste sensible à l'inhibition par la lysine, ce qui d'ailleurs n'est pas surprenant si c'est la carence en ornithine qui est responsable de l'effet observé.

Mais le mutant 02-I7, ornithine transaminase déficient, à activité arginasique normale, reste également sensible à l'inhibition de croissance (figure 30).

Donc, les effets inducteurs de la lysine sur ces enzymes cataboliques ne sont pas responsables de l'effet sur la croissance.

5.3. RECHERCHE DE L'ORIGINE DE L'INHIBITION DANS UN EFFET SUR LA BIOSYNTHESE DE L'ORNITHINE.-

Si la carence en ornithine est due à un effet négatif sur sa biosynthèse, il doit être possible d'obtenir des mutants insensibles à cet effet négatif. Par exemple, si le mécanisme de régulation en cause est une inhibition allostérique, il peut apparaître par réversion ou suppression, des mutants dont l'enzyme allostérique concerné est devenu insensible à l'effecteur.

Des revertants de 4 souches arg- non caractérisées génétiquement, ont été testés en présence de lysine. Parmi les revertants de la souche 04-23, des souches résistantes

....

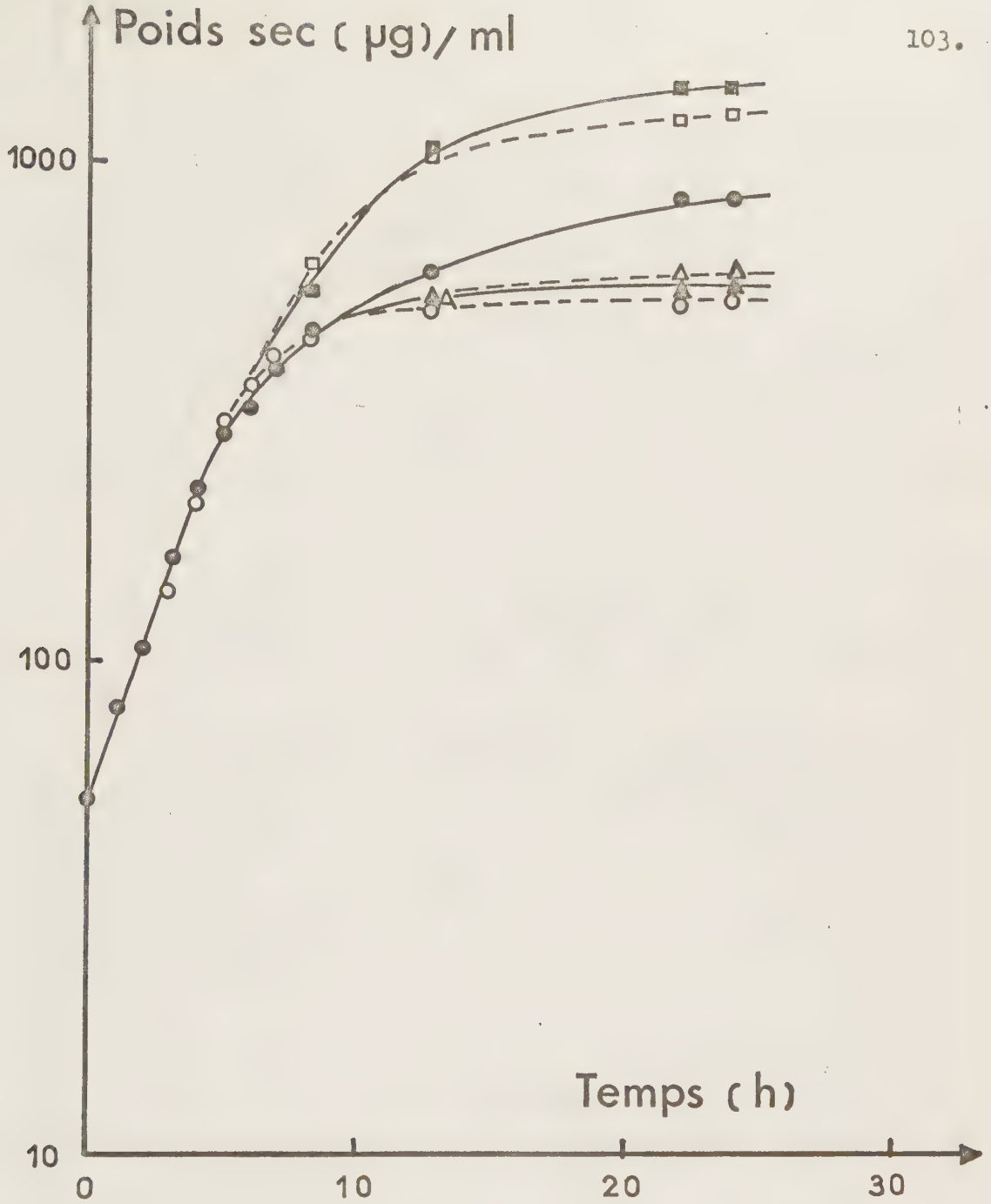


Fig.29. Effets comparés de la lysine, de l'arginine et de l'ornithine sur la croissance d'un mutant arginase-déficient.(souche 02-25).

—●— milieu W_1
– -○- – - milieu W_1 lys_1
—▲— milieu W_1 arg 0,5
– -△- – - milieu W_1 arg 0,5 lys_1
—■— milieu W_1 orn_1
– -□- – - milieu W_1 orn_1 lys_1

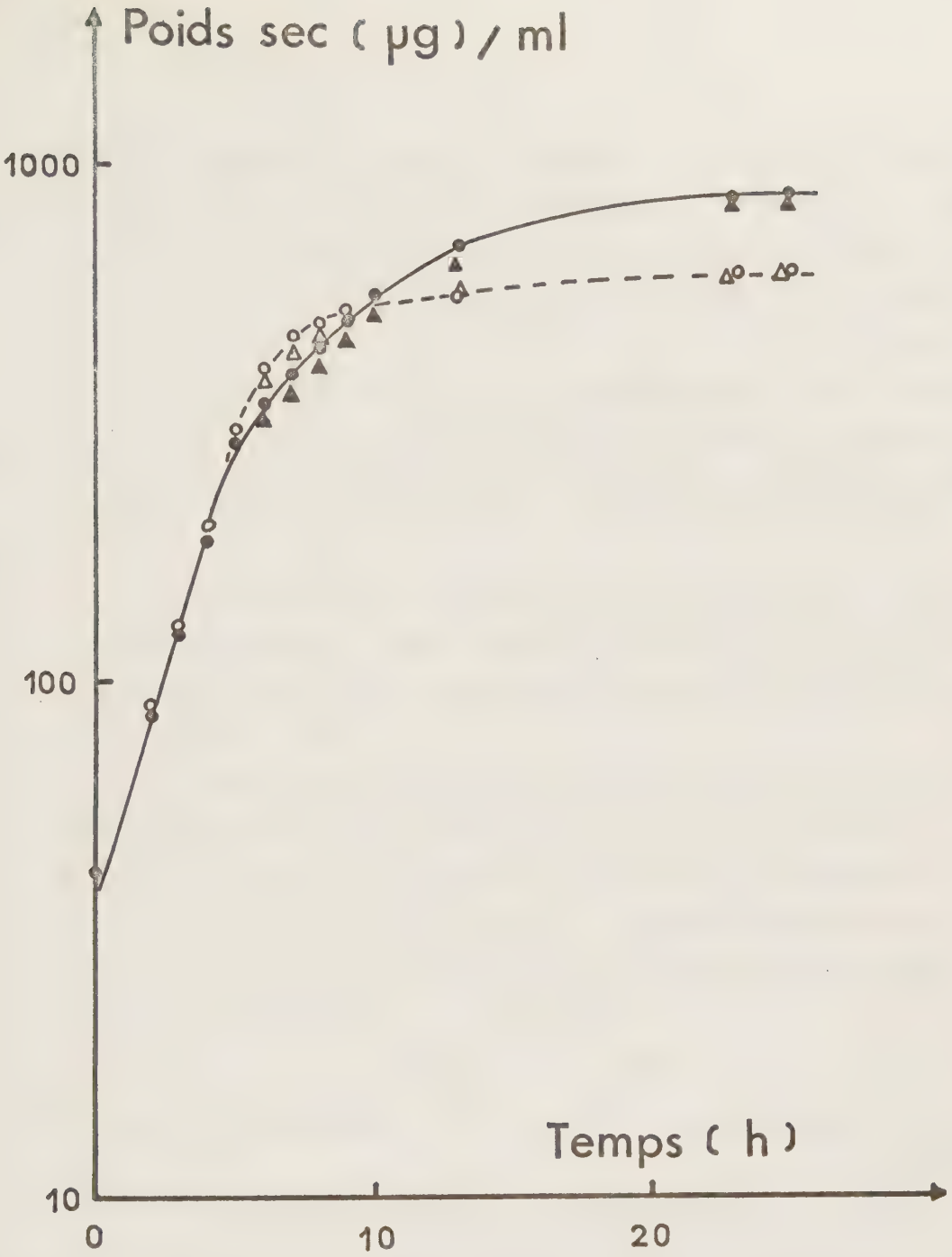


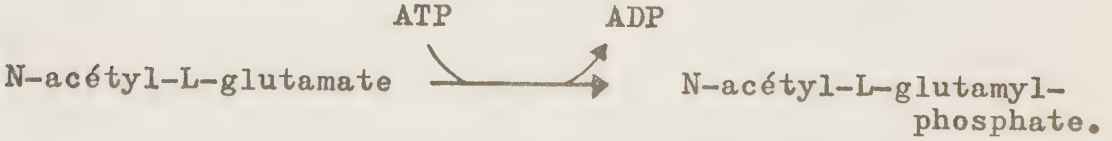
Fig.30. Comparaison des effets de la L-lysine sur la souche sauvage et sur un mutant ornithine transaminase déficient (souche 02-17).

—●▲— milieu W_1 ;
—o—Δ— milieu W_1 lys_1 ;
● o souche sauvage ;
▲ Δ souche 02-17.

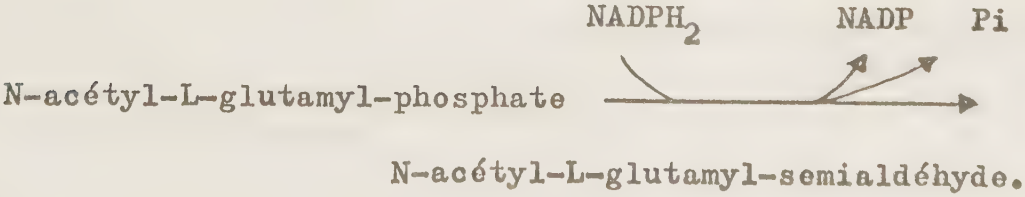
ont été obtenues : sur I6 souches isolées à la suite d'une première sélectionsur milieu gélosé, 7 souches se sont avérées présenter une certaine résistance sur milieu W_1 (tableau X); il est d'ailleurs apparu que cette résistance ne se manifeste pas sur milieu W_3 ni sur F_3 . L'explication réside sans doute dans les pH différents de ces milieux : le pH de W_1 est 5, les pH de W_3 et F_3 sont voisins de 6; or, on sait que les aminoacides basiques pénètrent mal aux bas pH, ce qui peut expliquer la différence observée.

Ces souches ont des temps de génération considérablement allongés : ce sont des bradytrophes; les courbes de croissance de la souche 04-23-04 sur W_1 sont présentées à la figure 3I .

Ces résultats suggèrent que l'enzyme affecté par la mutation 04-23 est sensible à la lysine et qu'il a perdu partiellement cette sensibilité dans les souches résistantes. La caractérisation génétique a permis d'identifier le gène affecté au gène arg 6, gène de structure codant pour la kinase qui catalyse la transformation :



Une étude directe de la kinase a d'abord été tentée, mais sans succès. Une autre possibilité consiste en l'étude globale des deux réactions, celle indiquée ci-dessus et la suivante :



....

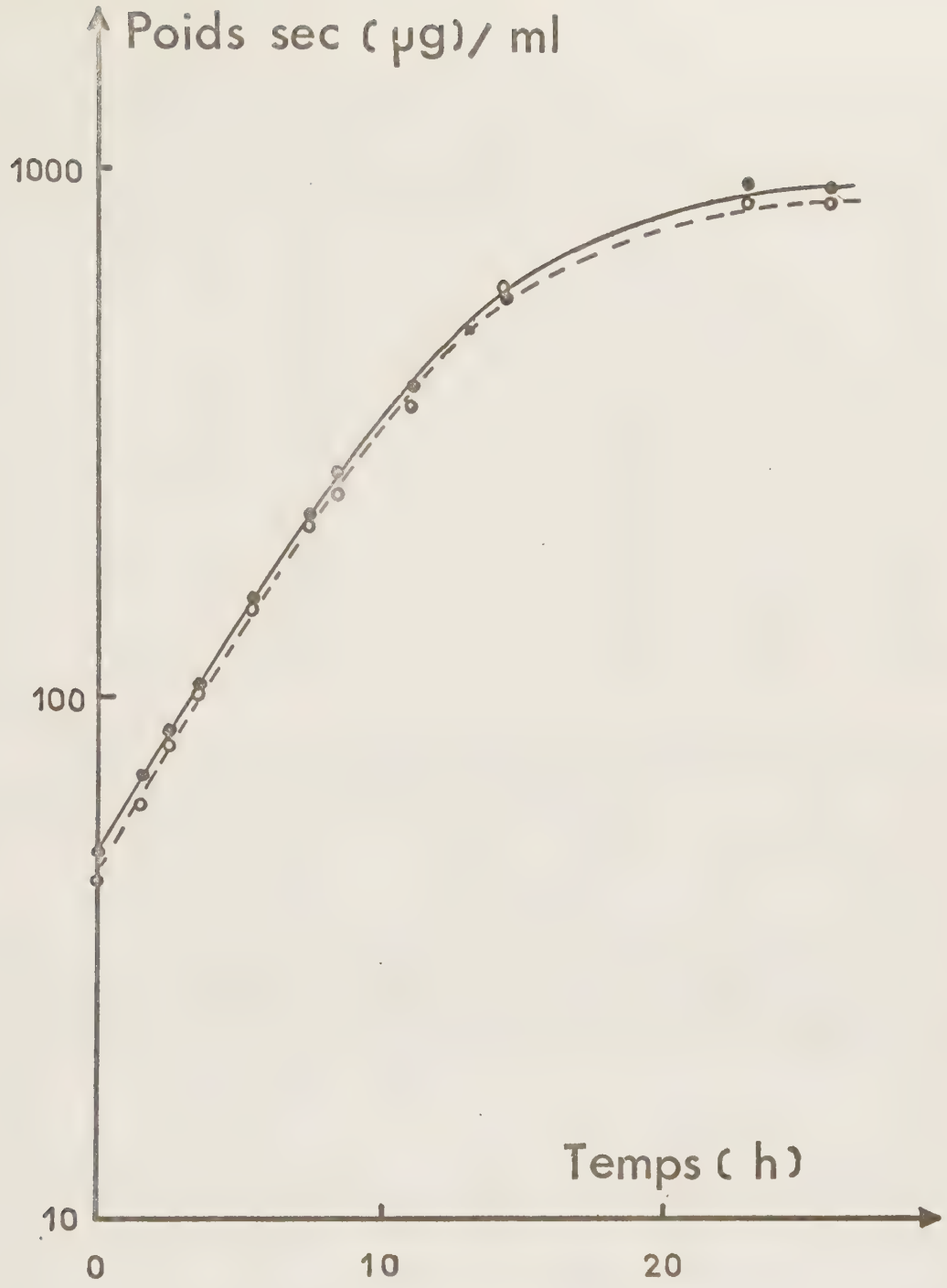


Fig.31. Effet de la L-lysine sur la croissance de la souche 04-23-04.

—●— Milieu W_1

--o-- Milieu W_1 lys_1.

Souche	Croissance totale* sur W_1	Croissance totale * sur W_1 lys_1	Temps de génération sur W1 (h et min)
sauvage	880	540	1.45
04-23-04	880	790	4.00
04-23-05	700	700	4.30
04-23-08	800	740	4.00
04-23-10	710	710	4.30
04-23-11	850	740	3.45
04-23-12	870	780	3.45
04-23-15	600	680	5.00

Tableau X

Croissance totale des souches sélectionnées parmi les revertants du 04-23, en présence et en absence de lysine.

* croissance totale = récolte après 26 h de culture - inoculum.

Souche	Expérience n°	activité enzymatique dans différentes conditions						
		témoin	+ arginine 8 mM	+ lysine 10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	100 mM
sauvage	1	+	ε					0
sauvage	2	+		+	+			
sauvage	3	+				ε	ε	
04-23-04	1	ε	ε					ε
04-23-04	2	ε	ε					ε

Tableau XI

Inhibition du système enzymatique convertissant le N-acetyl glutamate en N-acétyl glutamyl semialdéhyde par la L-arginine et la L-lysine.

\+ activité enzymatique comprise entre 0,4 et 1 nmole/ min.mg.
activité enzymatique inférieure à 0,1 nmole/min.mg.

0 pas d'activité décelable.

La mesure de la vitesse d'oxydation du $NADPH_2$ en présence d'ATP et de N-acétylglutamate, permet d'étudier globalement l'ensemble des deux réactions (voir paragraphe 2,2,4). Malgré les difficultés expérimentales, cette méthode a fourni quelques résultats intéressants.

En premier lieu, il a été observé (tableau XI) que le système enzymatique étudié est sensible non seulement à l'arginine, mais aussi à la lysine; les concentrations nécessaires à cette inhibition étant de l'ordre de 30 mM.

En second lieu, il a été constaté que chez le mutant résistant 04-23-04, l'activité enzymatique est très faible mais il n'a pas été possible de déterminer si la faible activité résiduelle décelée était sensible à la lysine.

5.4. SELECTION DIRECTE DE MUTANTS RESISTANTS A L'EFFET DE LA L-LYSINE.-

Ce travail a été mené parallèlement au travail précédent, dans l'espoir, si un tel mutant était obtenu, que son analyse renseignerait sur le point essentiel d'intervention de la L-lysine.

Par 30 cultures successives en présence de lysine, poursuivies une douzaine d'heures au-delà de la phase exponentielle, donc jusqu'à un stade où la lysine peut avoir un effet sélectif (voir partie expérimentale), un pourcentage élevé de souches résistantes à la lysine est apparu. Sur 20 souches isolées après une première sélection consistant à choisir les plus grosses colonies sur un milieu à la lysine, 9 se sont révèlées nettement résistantes sur milieu W_1; le tableau XII présente les données relatives aux trois souches les plus remarquables et la figure 32 les courbes de croissance de la souche I0-0I (lys R), pour laquelle la production en présence de lysine excède légèrement la production en l'absence de lysine. Les temps de génération des 3 souches sélectionnées ne sont pas sensiblement différents de celui de la souche sauvage.

....

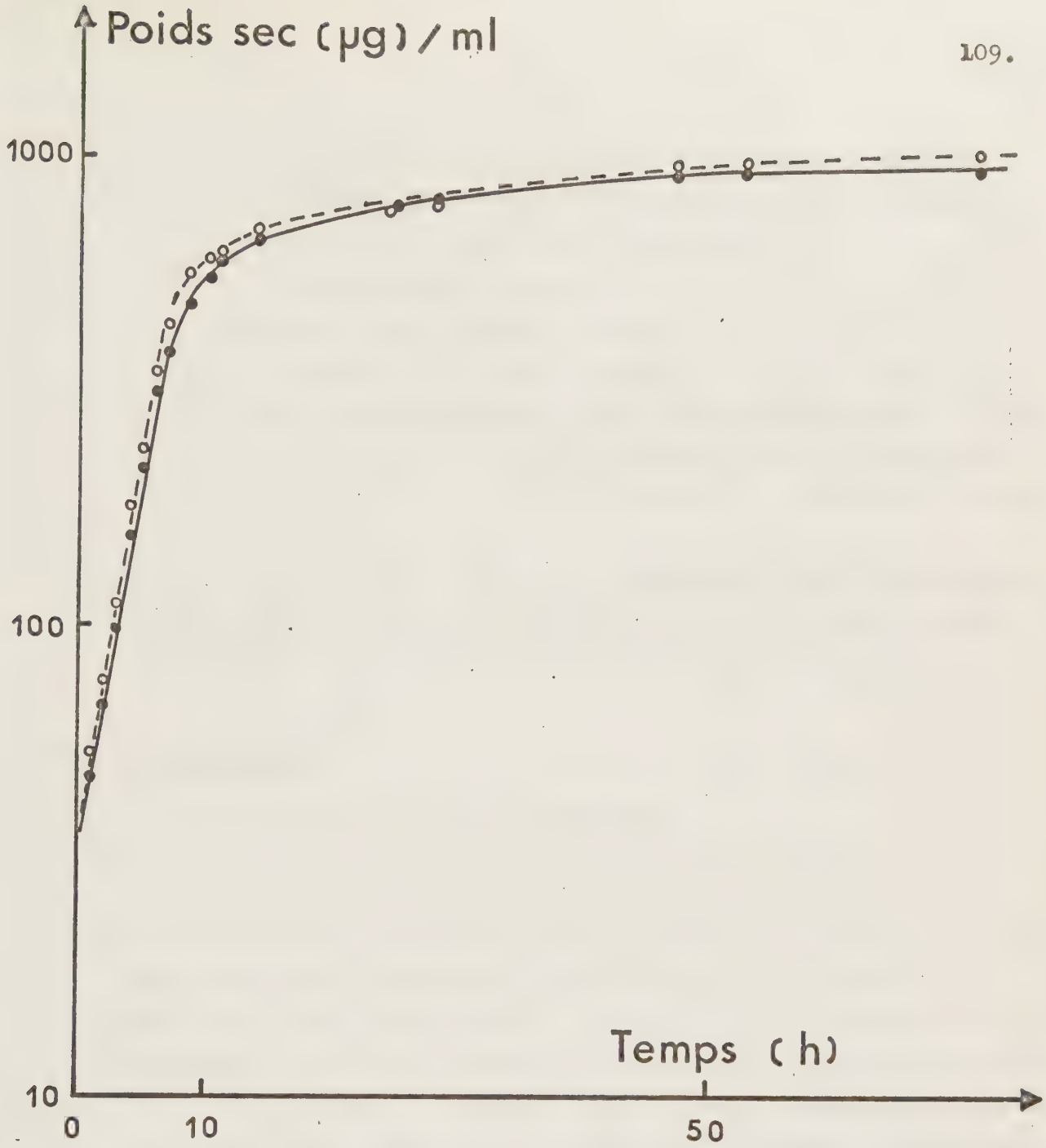


Fig. 32. Effet de la L-lysine sur la croissance de la souche 11-01 (lys R).

—●— milieu W_1

—o— milieu W_1 lys_1.

L'analyse des mutants obtenus devrait renseigner sur l'origine du blocage de croissance, à moins toutefois qu'il ne s'agisse de mutants de perméabilité.

L'expérience rapportée au tableau XIII montre que les concentrations globales atteintes 4 h après la fin de la phase exponentielle sont voisines; d'autre part, la distribution intracellulaire est assez différente : c'est dans les cellules de la souche sauvage que les concentrations de lysine dans l'extrait aqueux et l'extrait TCA sont les plus élevées.

Ces mutants sont donc vraisemblablement des mutants de perméabilité et, par suite, ne peuvent fournir aucun renseignement relativement au problème posé.

5.5. DISCUSSION.-

5.5.1.- Localisation du phénomène

Puisque l'inhibition se fait sentir même sur la croissance limitée qui a lieu sur milieu sans azote (fig.13), c'est que le point d'impact se situe au niveau du métabolisme azoté post-exponentiel. Mais jusqu'à maintenant, la localisation de l'origine de l'inhibition de croissance dans le métabolisme de l'arginine ne reposait que sur des analyses de pool et rien ne prouvait que la baisse des pool d'arginine et d'ornithine observée en présence de lysine, et vraisemblablement due à l'induction de l'arginase et l'ornithine-transaminase, soit l'une des causes du phénomène. Le fait que l'arginine et surtout l'ornithine antagonisent cet effet, représente l'argument qui manquait. En outre, les données acquises avec le mutant 02-25, arginase-déficient montrent que c'est la carence en ornithine plutöt que la carence an arginine qui est responsable de l'effet lysine.

Souche	Croissance totale * sur W_1	Croissance totale * sur W_1 lys1	Temps de génération sur W_1 (h et min).
sauvage	1 030	580	1.45
11-01	880	930	1.45
11-03	935	910	1.50
11-19	1 125	1 015	1.45

Tableau XII

Croissance totale des différentes souches lys R en présence et en absence de lysine.

* croissance totale = récolte après 50 h de culture - inoculum.

	Concentration atteinte µmoles/g sec	Extrait aqueux (A) µmoles/g sec	Extrait TCA (B) µmoles/g sec	A + B	Résidu µmoles/g sec
sauvage	1 140	30	388	418	590
11-01	1 390	8	250	258	680
11-02	990	18	256	274	510
11-03	1 210	15	202	217	620
11-08	1 360	14	334	348	630
11-09	1 180	10	280	290	760
11-17	1 335	7	202	209	740
11-19	1 310	6	220	226	520

Tableau XIII

Entrée et distribution intracellulaire de la l-lysine marquée.

L'expérience a été effectuée sur milieu W_2 inoculé, puis additionné de 1 mM de L-lysine marquée au ^{14}C quand le poids sec atteint 100 µg/ml (fin de la phase exponentielle vers 200 µg/ml). 4 h après la fin de la phase exponentielle on détermine la concentration intracellulaire totale et la distribution de la ^{14}C lysine dans la cellule.

L'idée d'incriminer l'ornithine plutôt que l'arginine ne ressortait nullement des analyses de pool, les variations du pool du premier acide aminé étant incomparablement plus faibles que celles du second. En fait, l'idée de mettre en cause l'ornithine et un éventuel retentissement sur le métabolisme des polyamines nous a été suggérée par Thuriaux (communication personnelle) s'appuyant sur le fait que, chez un mutant bradytrophe à taux d'arginine très bas, c'était cependant l'ornithine qui limitait la croissance (Thuriaux, I969).

Reste à déterminer l'origine de cette carence en ornithine liée à la présence de lysine. Le fait que le mutant 02-I7, ornithine-transaminase déficient, reste, comme le mutant 02-25, arginase déficient, sensible à la lysine, montre que ce n'est pas l'action positive sur le catabolisme qui est en cause et suggère de rechercher un effet négatif de la lysine sur la biosynthèse de l'ornithine.

L'isolement de la souche 04-23-04, dérivée d'une souche arg 6 par suppression et presque parfaitement résistante à l'effet de la lysine 1 mM sur milieu W_1 , montre que l'action de la lysine sur l'enzyme, produit du gène arg 6, est une cause déterminante du phénomène observé.

L'étude enzymatique a permis de confirmer que le mutant étudié était affecté au niveau de l'un des enzymes catalysant la transformation,

N acétylglutamate ⟶ N acétylglutamylsemialdéhyde,

la faible activité résiduelle expliquant sans doute sa bradytrophie.

Ce système enzymatique avait d'ailleurs été étudié antérieurement par De Deken (I963), qui avait montré la sensibilité à l'arginine, mais n'avait pas constaté de sensibilité à la lysine, faute d'avoir utilisé des concentrations suffisantes. Plus récemment, Wiame (I97I) et Minet (I97I) ont réétudié ce système sans signaler d'inhibition par la lysine, ni même par l'ornithine. Aux données relatives à ce système, nous avons donc ajouté la sensibilité à la lysine chez la souche sauvage, sans toutefois

...

parvenir à lui comparer la sensibilité de la souche 04-23-04.

Depuis ce travail, nous avons eu connaissance de la mise au point effectuée par Minet (I97I) de la mesure de l'activité enzymatique de la kinase; l'utilisation des méthodes proposées permettrait peut-être d'obtenir l'argument décisif, à savoir une baisse de sensibilité de la kinase du mutant à la lysine. En l'absence de cet argument, il est impossible d'écarter l'idée que la relation entre les propriétés de l'enzyme de la souche 04-23-04 et son insensibilité à la lysine ne soit qu'une relation indirecte et que cette insensibilité ne soit qu'une conséquence de la bradytrophie.

Comment se situent les concentrations inhibitrices par rapport aux concentrations observées ? La teneur en eau des cellules de notre levure étant de l'ordre de 63 %, on passe du nombre de μ moles/g sec à la concentration molaire dans la solution intracellulaire par la relation approximative :

$$\text{concentration (mM)} = \text{nombre de } \mu\text{moles/g sec} \times \frac{1}{2}$$

Il en résulte que le seuil d'inhibition (30 à 40 mM) est de l'ordre des concentrations observées sur milieu minimum, et environ I0 fois inférieur à la concentration observée en présence de lysine. Remarquons aussi que le taux d'arginine présente en phase exponentielle sur milieu minimum est I0 à 20 fois supérieur au seuil d'inhibition par cet acide aminé. Or, cette concentration élevée ne bloque sans doute pas plus la biosynthèse qu'elle n'induit le catabolisme; nous savons que si l'arginase et l'ornithine transaminase ne sont pas induites en phase exponentielle, c'est dû à la répression catabolique, mais les raisons pour lesquelles la biosynthèse a lieu et parconséquent la N acétylglutamokinase fonctionne en présence de concentrations élevées d'arginine ou de lysine sont moins claires. La compartimentation intracellulaire peut être invoquée, mais on peut aussi penser que la rétroaction exercée sur

...

l'acétylglutamokinase n'est suffisante pour arrêter le flux biosynthétique qui conduit à l'ornithine que lorsque ce flux se réduit du fait de l'épuisement progressif de la source d'azote, et lorsqu'en phase post-exponentielle ce flux est entretenu à une valeur faible par le turn over protéïque.

5.5.2. Propriétés des mutants lys R.-

Le fait que des mutants résistants puissent être obtenus facilement par sélection directe, montre que le phénomène observé est d'une importance biologique suffisante pour donner prise à la sélection. Mais, conformément à la règle qui veut que la résistance s'acquière le plus souvent par une mutation de perméabilité, les mutants lys R ont une perméation perturbée : l'entrée nette est ralentie de 50 % en moyenne et la taille du pool est abaissée de 37 % en moyenne.

L'expérience relatée au tableau III nous ayant montré que l'effet lysine ne s'observe qu'à partir d'une concentration intracellulaire de lysine libre, de l'ordre de 500 à 600 μmoles/ g sec, la concentration sensiblement plus faible observée dans les cellules des mutants lys R suffit sans doute à expliquer leur résistance à l'effet lysine.

5.5.3. Conséquences de la carence en ornithine.-

De ce qui précède, il résulte que la cause de l'effet lysine réside dans la carence en ornithine, résultant elle-même vraisemblablement de l'inhibition de la N-acétylglutamokinase.

Mais quelle peut être l'importance pour la cellule de cette carence en ornithine ? Outre son rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse de l'arginine, l'ornithine représente le point de départ de la biosynthèse des

...

polyamines, putrescine, spermidine et spermine. L'idée de nous intéresser à ces substances nous a d'ailleurs été suggérée, en même temps que celle d'incriminer l'ornithine, par Thuriaux (communication personnelle).

Dès maintenant, deux arguments peuvent justifier une mise en cause du métabolisme des polyamines :
- en premier lieu, le fait que les perturbations de ce métabolisme se traduisent aussi bien chez E. coli (Maas et all. I970) que chez Neurospora (Davis et all. I970), par des altérations morphologiques qui ne sont pas sans analogie avec celles observées chez S. cerevisiae en présence de lysine, cellules géantes à division bloquée;
- en second lieu, l'analogie entre l'inhibition de croissance engendrée par la lysine et celle engendrée par l'arginine chez un arginase-déficient. Signalée au paragraphe 5.I., cette analogie est déjà apparente dans le tableau IX. Or, un tel effet inhibiteur de l'arginine sur la croissance d'un mutant arginase-déficient a été observé par Davis et all. (I970) chez Neurospora, et attribué sans ambiguité à un effet sur la biogénèse des polyamines; l'inhibition est antagonisée par la putrescine, qui agit sans doute par le biais de sa transformation en spermidine, car le taux de cette dernière est dans les conditions de l'inhibition IO fois inférieur à la normale; sauf chez des mutants multiples, l'effet ne se manifeste qu'après une croissance prolongée, apparemment en phase post-exponentielle. Notre apport a été de montrer que chez S. cerevisiae, ce phénomène s'observe également et que l'effet exercé par la lysine est d'apparence identique à celui exercé par l'arginine sur une souche arginase-déficiente.

Remarquons d'ailleurs qu'une inhibition analogue par l'arginine s'observe chez des mutants d'E. coli déficients en agmatine uréohydrolase et que ce phénomène s'observe particulièrement bien sur milieu gélosé (Hirschfield et all. I970), ce qui rejoint l'une de nos observations antérieures (§ 3.2.2)

Sans représenter des preuves d'une implication du métabolisme des polyamines dans le phénomène considéré, ces arguments nous semblent une justification suffisante d'une étude des relations entre lysine et polyamines.

CHAPITRE VI - RELATION ENTRE EFFET LYSINE, BIOSYNTHESE DES POLYAMINES, BIOSYNTHESE DES RNA et DES PROTEINE

L'implication des polyamines dans le phénomène étudié a été testée d'abord par des essais d'antagonisation de l'inhibition de croissance par diverses polyamines, puis par des analyses des polyamines cellulaires dans différentes conditions. Enfin, les relations avec la régulation de la biosynthèse des macromolécules ont été recherchées.

6.I.- PROTECTION CONTRE L'EFFET LYSINE PAR ADDITION DE POLYAMINES AU MILIEU.-

L'étude s'est trouvée compliquée par l'incidence complexe, tant en présence qu'en absence de lysine, du pH et de la concentration des polyamines.

Parmi les quatre produits testés, putrescine, cadavérine, spermidine, spermine, seuls les deux derniers se sont avérés pourvus d'une certaine efficacité protectrice.

Etant donné l'énorme importance du pH sur l'entrée des polyamines dans les cellules, une optimisation approximative a été effectuée (figures 33-34); c'est vers pH 6,5 à 7 que l'effet inhibiteur propre aux polyamines (sur milieu sans lysine) est minimum et que l'effet antagoniste à l'égard de la lysine est maximum; il faut noter qu'à ce pH la croissance est lente ($g \sim 3$ h).

L'étude de l'effet des concentrations a ensuite été menée à pH 7 (figures 35 - 36) avec les résultats suivants : les deux produits exercent avec et sans lysine un effet d'abord favorable puis défavorable; toutefois les courbes ne sont pas parallèles et se recoupent vers la droite, ce qui traduit une atténuation progressive de l'effet lysine; pour les essais ultérieurs la spermidine et la spermine sont employées aux concentrations assurant la production optimale en présence de lysine, soit respectivement 5 mM et 0,75 mM.

...

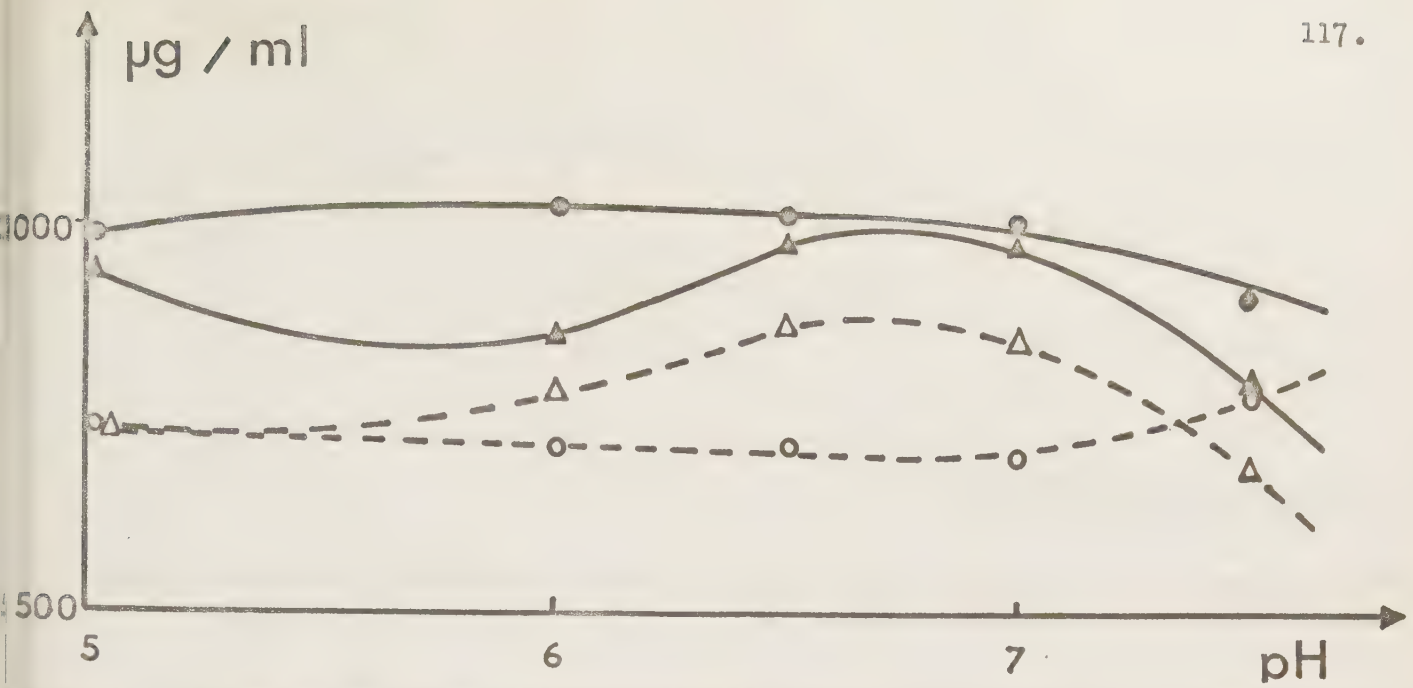


Fig.33. Influence du pH sur l'antagonisation par la spermidine de l'effet lysine.

Les ordonnées représentent les poids secs obtenus après 25 h sur milieu tamponné par un tampon phosphate M/30.

—o— témoin ; – – –σ– + L-lysine 1 mM;

—▲— + spermidine 10 mM ; – – Δ + spermidine 10 mM + L-lysine 1 mM.

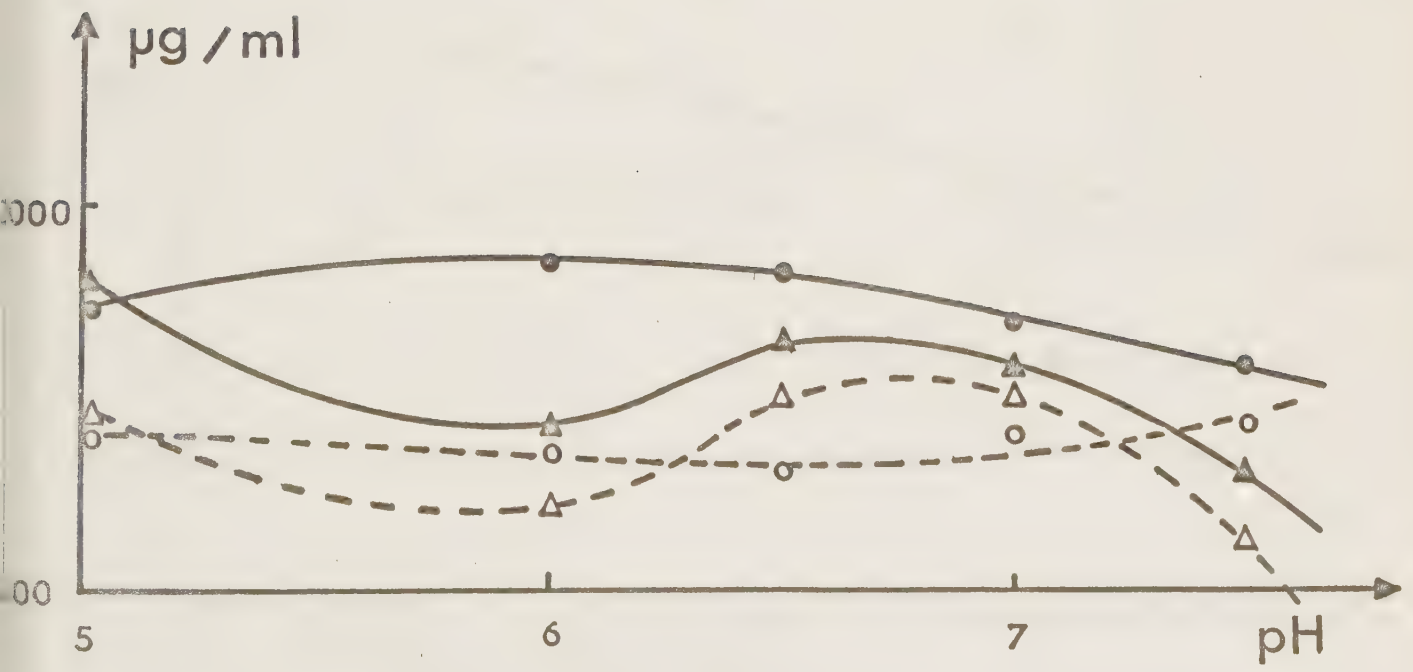


Fig.34. Influence du pH sur l'antagonisation par la spermidine de l'effet lysine.

Les ordonnées représentent les poids secs obtenus après 25 h sur milieu tamponné par un tampon phosphate M/30.

—o— témoin ; – – –o– + L-lysine 1 mM ;

—▲— + spermidine 1 mM ; – –△– + spermidine 1 mM + L-lysine 1 mM.

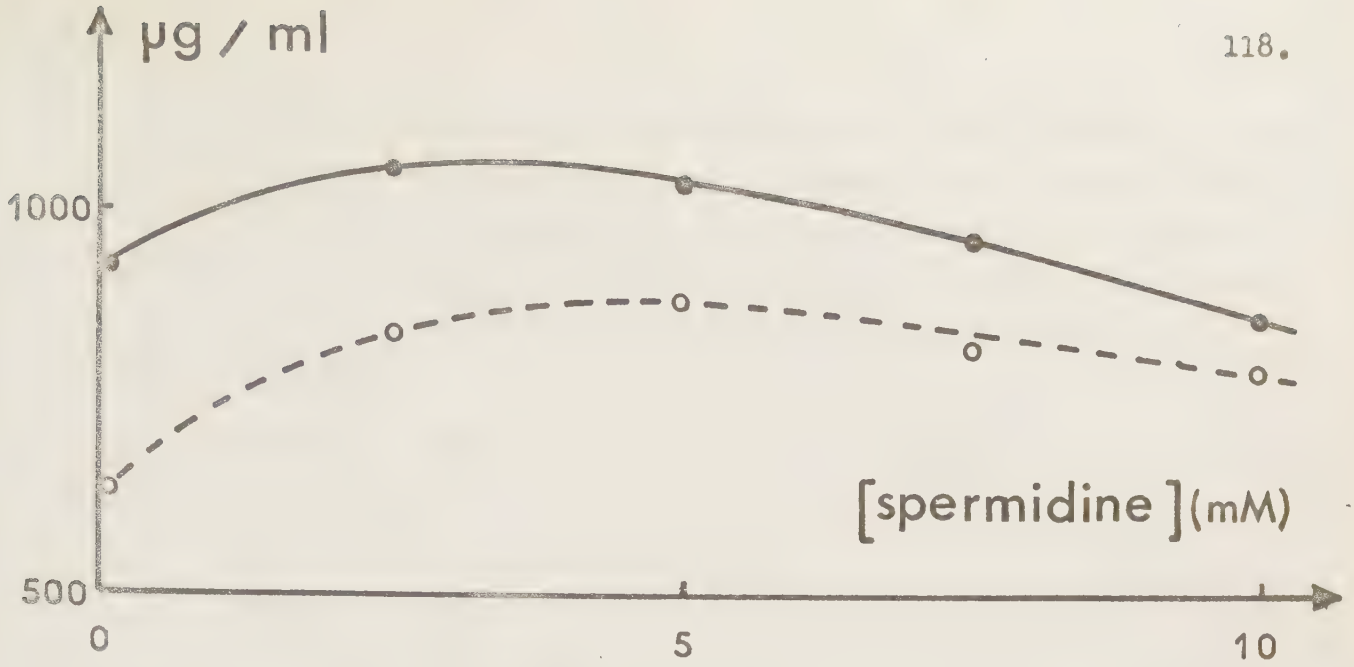


Fig.35. Influence de la concentration en spermidine sur l'antagonisation de l'effet lysine à pH 7.

—●— W_1 + spermidine ;

--○-- W_1 + spermidine + L-lysine 1 mM.

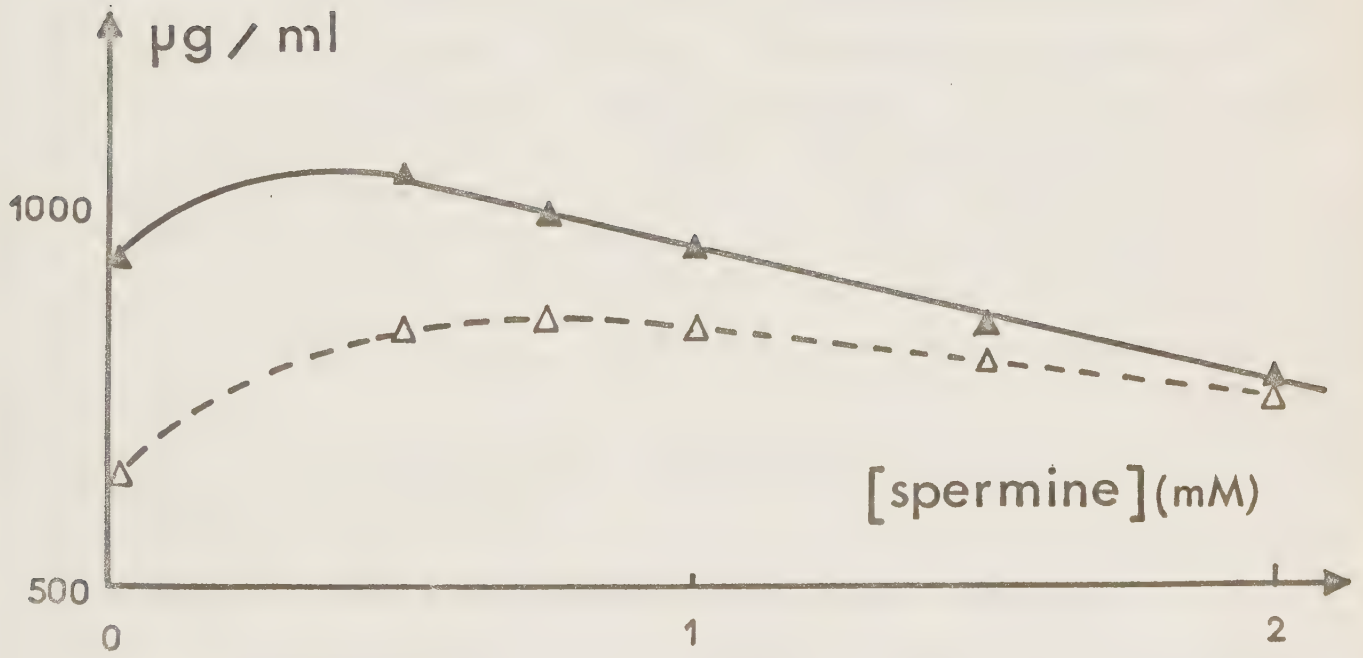


Fig.36. Influence de la concentration en spermine sur l'antagonisation de l'effet lysine à pH 7.

—▲— W_1 + spermine ;

--△-- W1 + spermine + L-lysine 1 mM.

Pour permettre l'interprétation de ces données, il est nécessaire de contrôler que les polyamines en tant que sources d'azote uniques, ne permettent pas de dépasser la croissance observée en l'absence totale d'azote; les récoltes de levure au cours d'une expérience destinée à tester ce fait ont été les suivantes :

(milieu de base WS pH 7 sans NH_4^+	; inoculum	40 µg/ml) :
$(NH_4)_2$ SO_4 1 mM	"	960 µg/ml
spermidine chlorhydrate 5 mM	"	I74 µg/ml
spermine chlorhydrate 0,75 mM	"	I53 µg/ml
putrescine chlorhydrate 5 mM	"	I53 µg/ml
0	"	I74 µg/ml

D'autre part, l'incidence des polyamines sur l'entrée des aminoacides ne semble pas d'une grande importance (Tabor et Tabor I966, Grenson I967).

Si l'effet des polyamines s'explique donc par le fait qu'elles font défaut en fin de croissance, chez un sauvage en présence de lysine, comme chez un orn- en présence d'arginine, elles doivent dans les deux cas pouvoir antagoniser l'effet défavorable; bien plus, un mutant à la fois arginase-déficient et auxotrophe pour l'ornithine, devrait être dépendant non seulement de l'arginine, mais aussi des polyamines.

Les figures 37 - 38 font apparaître les résultats suivants :

- les rendements sont abaissés par la présenee de spermidine et de spermine dans tous les cas, sauf chez le 02-25 (arginase-déficient) en présence de spermine; la baisse est particulièrement importante chez le double mutant;

- dans tous les cas en présence de spermidine ou de spermine, le rendement atteint en présence de lysine est supérieur à celui atteint en son absence, ce qui suggère l'existence d'un certain antagonisme entre ces substances.

Pour ces deux souches particulières, la putrescine s'est encore révèlée sans aucun effet sur le rendement de la croissance, que la lysine soit présente ou non.

....

Fig.37. Influence de la spermidine, de la spermine et de l'ornithine sur la croissance d'une souche arginase déficiente.

Souche 02-25. Les ordonnées représentent les poids secs obtenus après 27 h.
□ milieu W_1 ; ▥ milieu W_1 lys_1 ; ▨ milieu W_1 arg 0,5.
spd 5 : spermidine 5 mM ; spe 0,75 : spermine 0,75 mM ; orn 1 : ornithine 1 mM.

Fig.38. Influence de la spermidine, de la spermine et de l'ornithine sur la croissance d'un double mutant arginase déficient, ornithine-.

Souche : hybride du 02-25 avec une souche nécessitant l'ornithine.
Les ordonnées représentent les poids secs après 27 h.
□ W_1 arg 0,5 ; ▥ W_1 arg 0,5 lys_5 ; spd, spe, orn, cf ci-dessus.
L'ornithine n'a pas été utilisée en addition mais en remplacement de l'arginine.

6.2 - ANALYSE DES POLYAMINES INTRACELLULAIRES PENDANT LA CROISSANCE EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE LYSINE.-

L'analyse de ces polyamines suivant la méthode indiquée au paragraphe 2.2.2, conduit au chromatogramme présenté à la figure 39.

Au premier examen, on distingue deux taches importantes; l'une(X) située au niveau de la spermine est très réduite en l'absence de lysine et n'apparaît que progressivement à partir de la fin de la phase exponentielle, en présence de lysine seulement; l'autre (Y) située au niveau de la spermidine est d'importance relativement constante. Enfin, avec des dépôts importants et des migrations de courte durée, il est possible de mettre en évidence une tache Z dans la région des diamines.

Ces substances X et Y avaient d'abord été interprètées comme étant la spermidine et la spermine, mais diverses observations ont conduit à remettre en cause cette première identification (voir ci-dessous). Elles ont cependant été dosées sur TLC par densitométrie, en leur attribuant arbitrairement les coefficients de coloration respectifs de la spermidine et de la spermine, ce qui a permis de représenter l'évolution de leurs concentrations au cours de la croissance avec et sans lysine (figure 40). Ce graphique précise les conditions d'apparition du produit X.

6.3 - ESSAIS D'IDENTIFICATION DES POLYAMINES INTRACELLULAIRES.-

Les analyses chromatographiques de longue durée (48 à 72 heures) en cuve à élution continue soulèvent un doute quant à l'identité des taches observées en présence et en absence de lysine, et mettent en évidence le caractère composite de certaines au moins de ces taches.

Cependant, elles montrent aussi que les tétramines, les triamines et les diamines se répartissent en trois zones successives (fig. 41) coïncidant respectivement avec X, Y, Z, ce qui nous autorise sans doute

.....

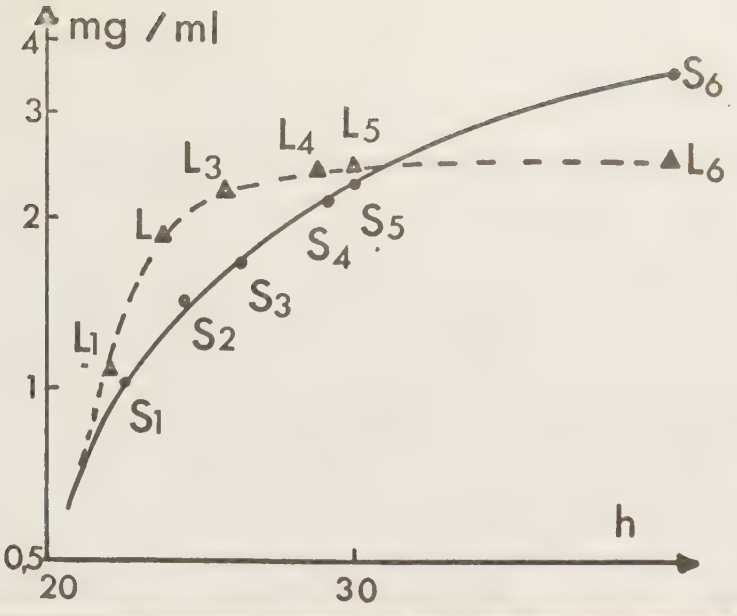


Fig.39. Analyse de la fraction polyamines à divers stades de la croissance en absence et en présence de lysine.

S : levure cultivée sur F_3

L : levure cultivée sur F_3 lys_5

E : étalon ; à partir de la ligne de départ spermine, spermidine, putrescine, cadavérine (2,5 nmoles).

Les quantités d'extraits déposés correspondent à 0,5 mg sec de levure.

Mélange Morris et Pardee (1966)

4 élutions successives.

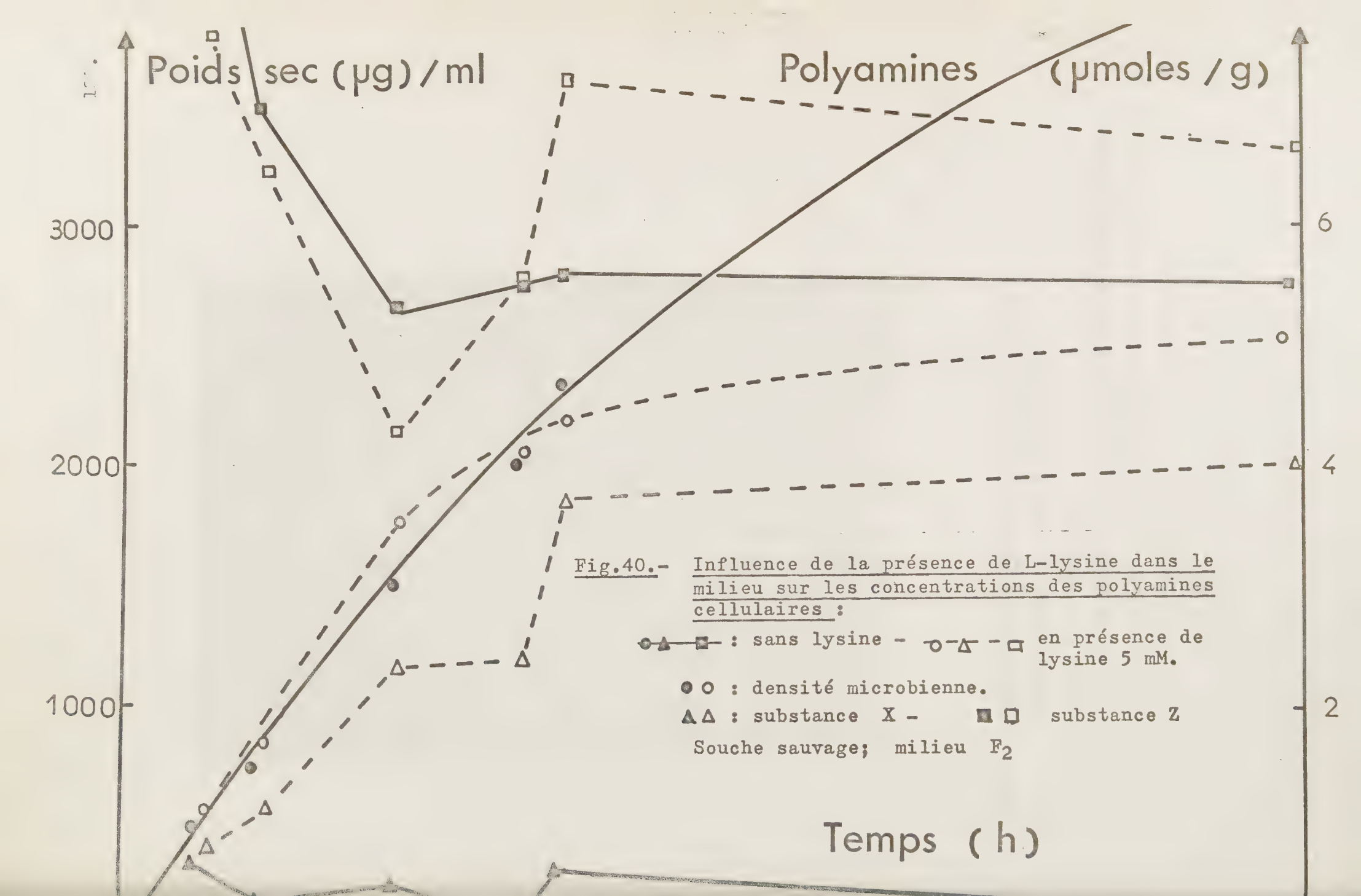


Fig.40.- Influence de la présence de L-lysine dans le milieu sur les concentrations des polyamines cellulaires :

—●—▲—■— : sans lysine - -○-△-□- en présence de lysine 5 mM.

●○ : densité microbienne.

▲△ : substance X - ■□ substance Z

Souche sauvage; milieu F_2

Fig.41. Chromatogramme des polyamines disponibles.
Solvant Morris et Pardee (1966).
Elution continue 48 h.

DAP : diaminopropane ; IBP : imino-bis-propylamine ;
PUT : putrescine ; SPD : spermidine ;
CAD : cadavérine ; SPE : spermine.

à affirmer, dès maintenant, que les polyamines X sont des tétramines, les Y des triamines et les Z des diamines.

Pour poursuivre l'identification, nous avons effectué des chromatographies en bandes de quantités de l'ordre de 500 n moles, en des temps de 2 à 3 jours; l'élution séparée des bords inférieurs et supérieurs des bandes permet d'obtenir un certain nombre de fractions impures baptisées L_a , L_b , L_c , L_d , L_e , en présence de lysine (fig. 42) et S_a , S_b , S_c , S_d , S_e en son absence.

L'analyse sur couche mince de ces fractions et leur comparaison avec les polyamines étalons, a fourni quelques renseignements intéressants malgré la difficulté créée par l'incidence des quantités déposées sur la distance de migration (fig. 42 et 43).

Cette analyse suivie d'une confrontation avec les polyamines de référence (fig. 44 45, 46, 47) a fourni les renseignements suivants :

- la tache X est simple en culture sur milieu minimum (X_s) et double en présence de lysine (X_{l1} et X_{l2}); les taches X_s et X_{l1} correspondent vraisemblablement à la spermine.
- la tache Y est simple en culture sur milieu minimum (Y_s) et double en présence de lysine (Y_{l1} et Y_{l2}) ; les taches Y_s et Y_{l1} correspondent vraisemblablement à la spermidine;
- la tache Z_l est certainement la cadavérine, mais en ce qui concerne la tache Z_s qui est vraisemblablement la putrescine, un doute subsiste à cause de la très faible concentration du produit.

Remarques :

- Les polyamines de référence (Calbiochem) elles-mêmes sont impures : la spermine contient un

.....

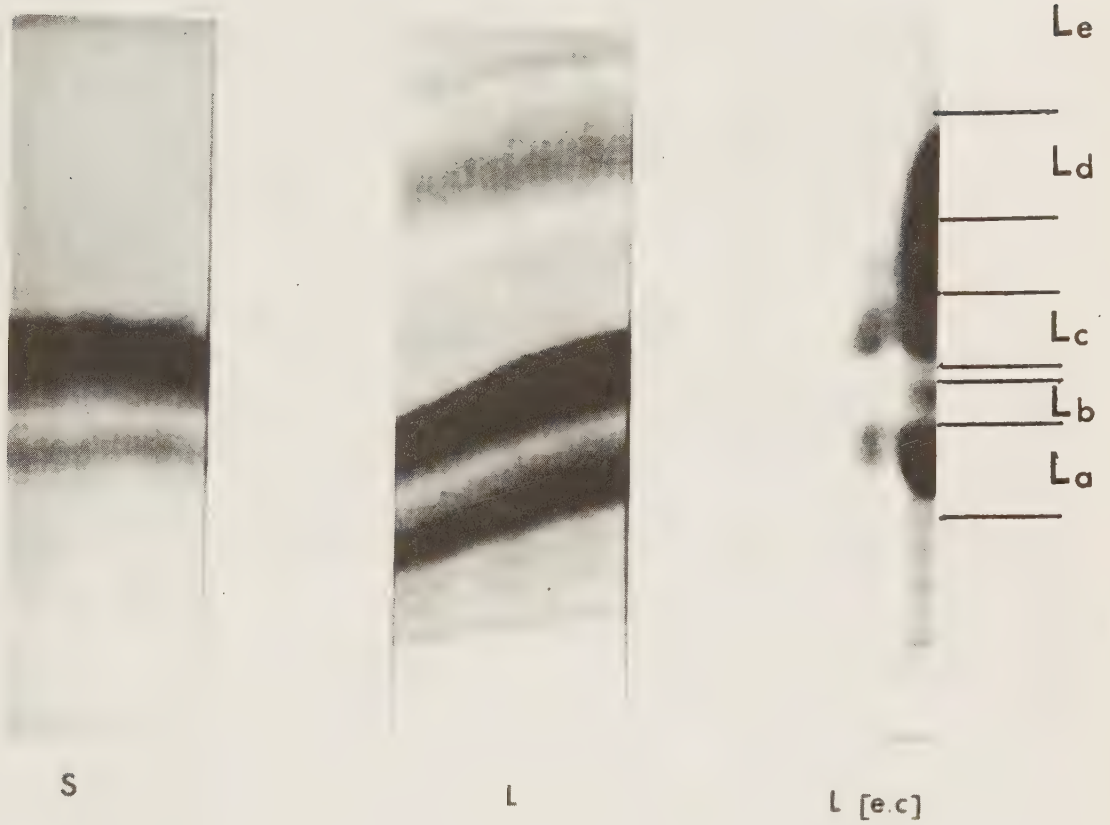


Fig.42. Chromatogrammes mettant en évidence la complexité des taches X et Y et la différence entre les compositions des extraits de cultures sur F_3 et sur F_3 lys_5.

S : extrait de cellules cultivées sans lysine ;

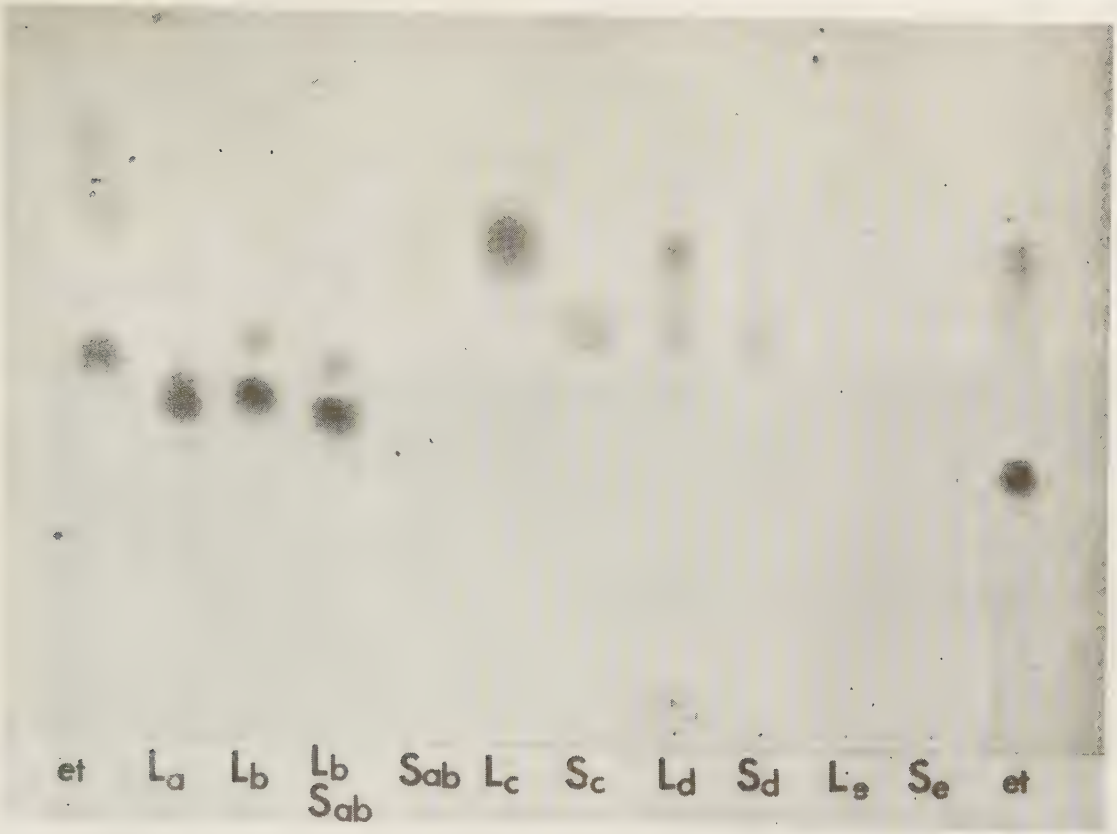
L : extrait de cellules cultivées en présence de lysine.

Ces deux chromatogrammes ont été obtenus par 4 élutions sur mélange de Morris et Pardee (1966).

L (e.c.) : produit analysé par une élution continue de 3 jours sur le même solvant.

Le schéma annexé indique comment a été effectué le fractionnement et précise la nomenclature.

Fig.43. Incidence de la quantité déposée sur la migration.
Les quantités déposées sont indiquées en nmoles.
spe : spermine ; spd : spermidine ;
put : putrescine ; cad : cadavérine.
Mélange Morris et Pardee (1966).
Cuve à élution continue 48 h.



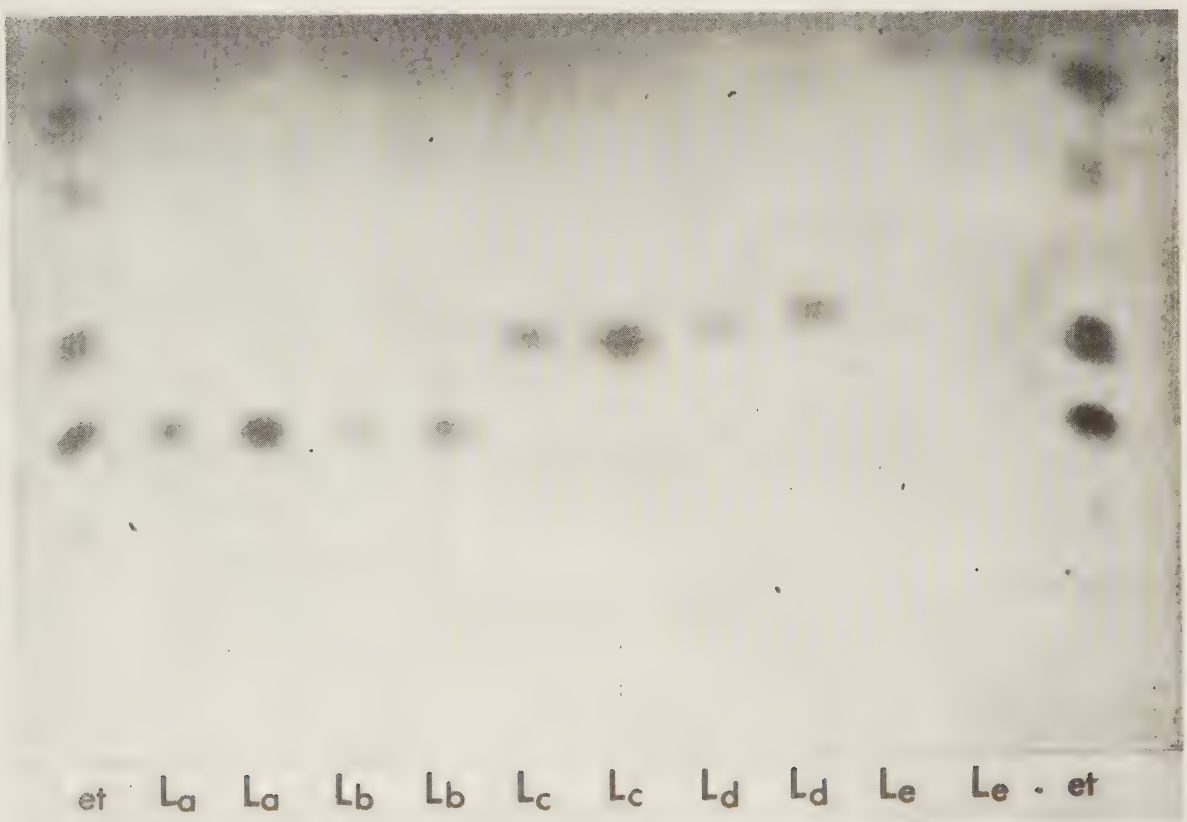


Fig.44. Deux essais de fractionnement (A premier essai - B deuxième essai). Les différents composants apparaissent sur la chromatographie, mais les fractions L_b et L_d sont encore complexes.
Solvant Morris et Pardee (1966).
Elution continue 48 h.

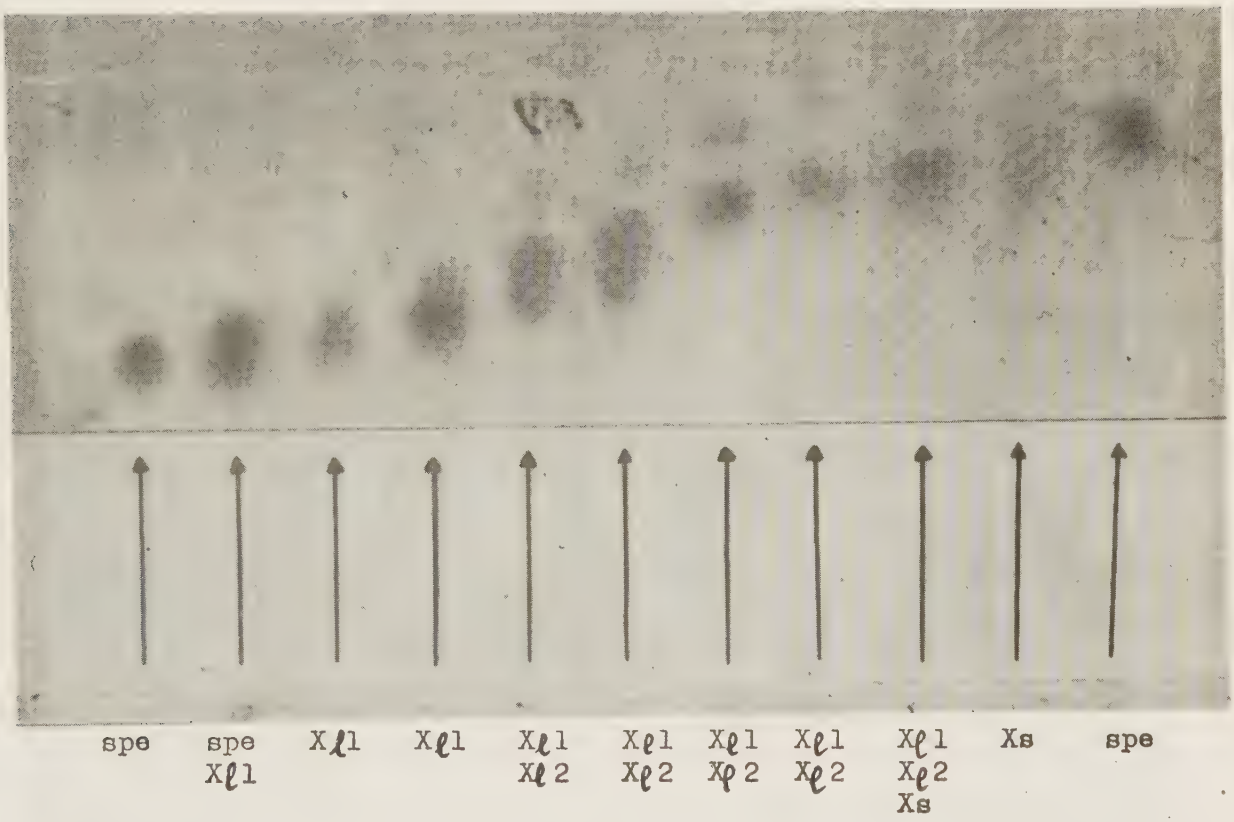


Fig.45. Confrontation des taches X avec les polyamines de référence.
Solvant Morris et Pardee (1966)
Elution continue 72 h.
La comparaison des divers mélanges X 1, X 2 suggère que X 1 est en réalité double.

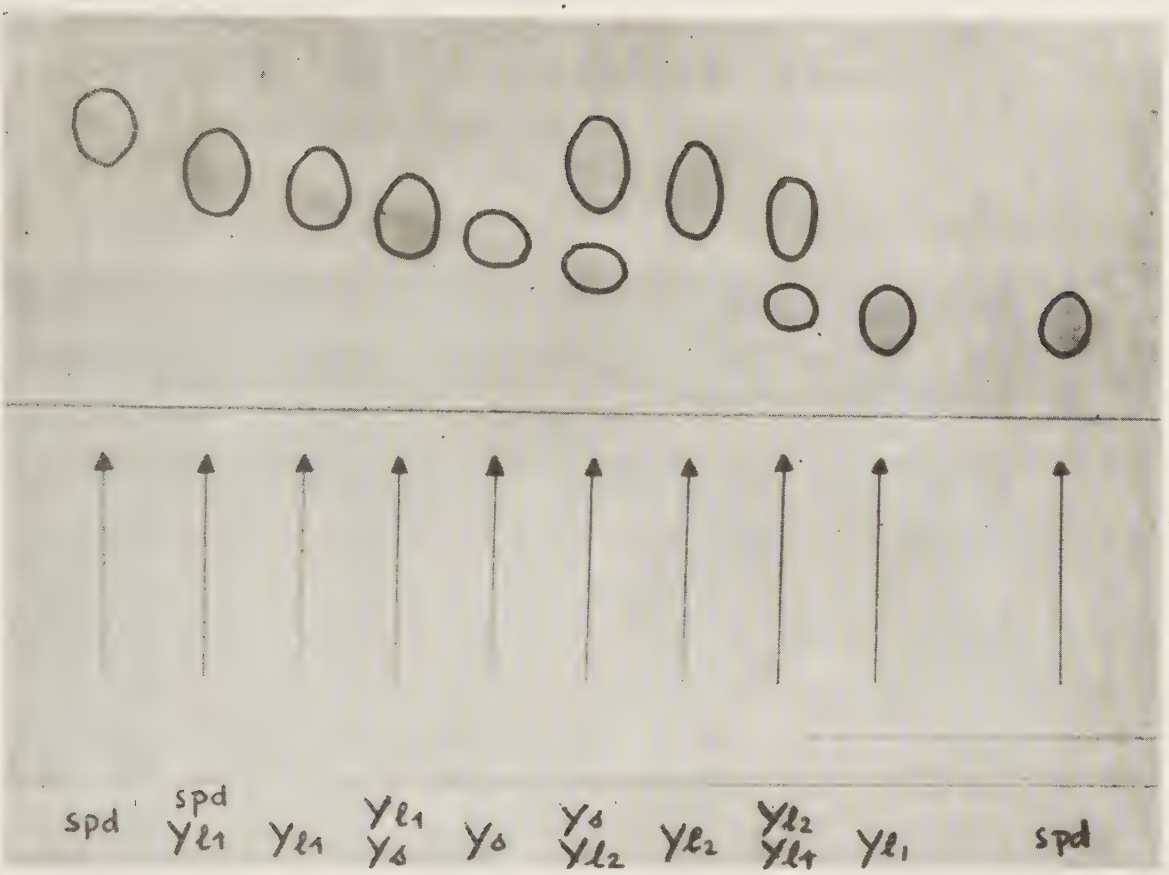


Fig.46. Confrontation des taches Y avec les polyamines de référence.
Solvant Morris et Pardee (1966).
Elution continue 72 h.

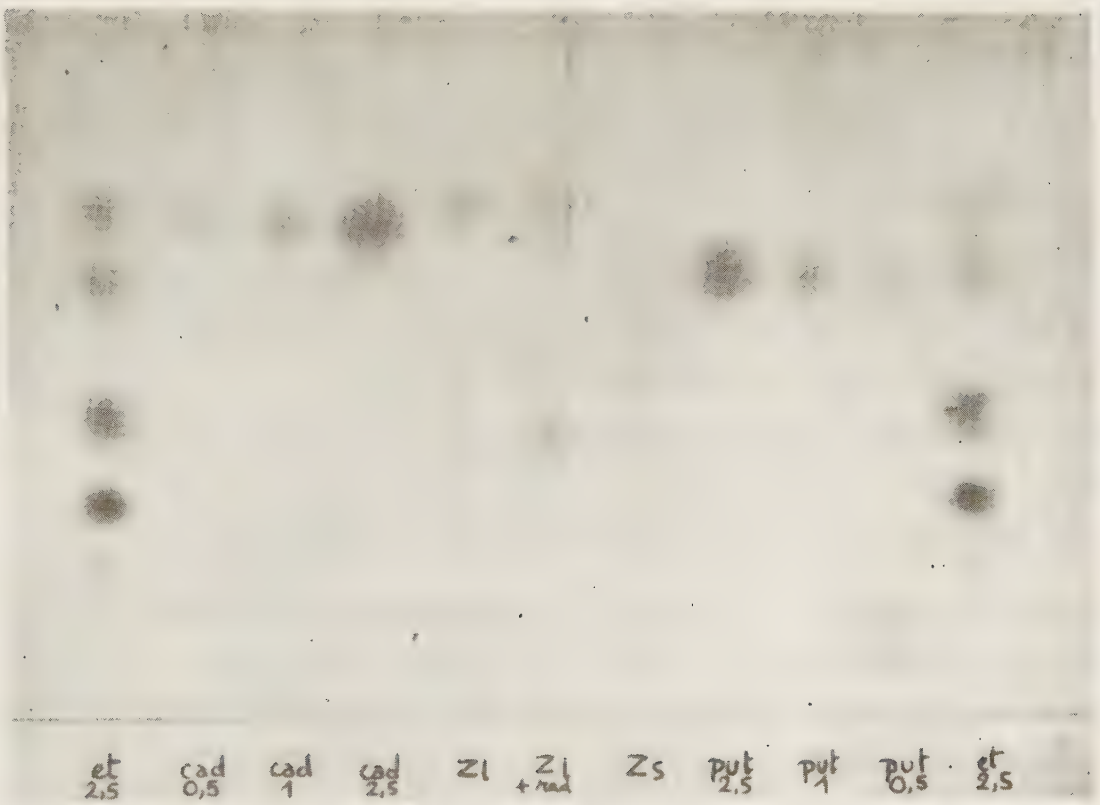


Fig.47. Confrontation des taches Z avec les diamines de référence.
Mélange Morris et Pardee (1966).
Elution continue 48 h.

produit parasite de Rf très bas; la spermidine se dédouble parfois après une élution de 2 à 3 jours. Certains auteurs ont signalé des effets différents suivant la provenance commerciale des produits utilisés.

- Les proportions relatives des différents composants sont estimées respectivement pour

$X_{\ell 1}$, $X_{\ell 2}$, $Y_{\ell 1}$, $Y_{\ell 2}$, Z_{ℓ} à 30,5 , 50, I5,5

X_s , Y_s , Z_s à I4, 85,1.

Il reste à confirmer les identifications chromatographiques assez peu sûres et à tenter l'identification des produits $X_{\ell 2}$ et $Y_{\ell 2}$.
Malheureusement, la purification insuffisante ne nous a pas permis jusque-là de résoudre parfaitement le problème.

Nous avons d'abord cherché à obtenir des informations par l'étude spectroscopique des combinaisons avec le D N F B, (Mc. Intère et al. I953, DUBIN I960);
il est alors apparu rapidement que le rapport A_{350}/A_{390} dépendait grandement de la quantité de polyamine utilisée, ce qui nous a amené à tracer les graphiques de la figure 48 permettant de comparer le rapport $A350/A390$ d'une polyamine anonyme avec la valeur $A350/A390$ d'une polyamine étalon présentant la même A350.
Le tableau IV présente les résultats obtenus avec les fractions séparées lors du second fractionnement qui, comme le montre la figure 44, sont relativement pures :

- en ce qui concerne le produit $Z\ell$, les données confirment qu'il s'agit d'une diamine, sans permettre de préciser laquelle, mais la dispersion observée entre les différentes diamines sur couche mince est suffisante pour permettre d'affirmer qu'il s'agit de la cadavérine;

....

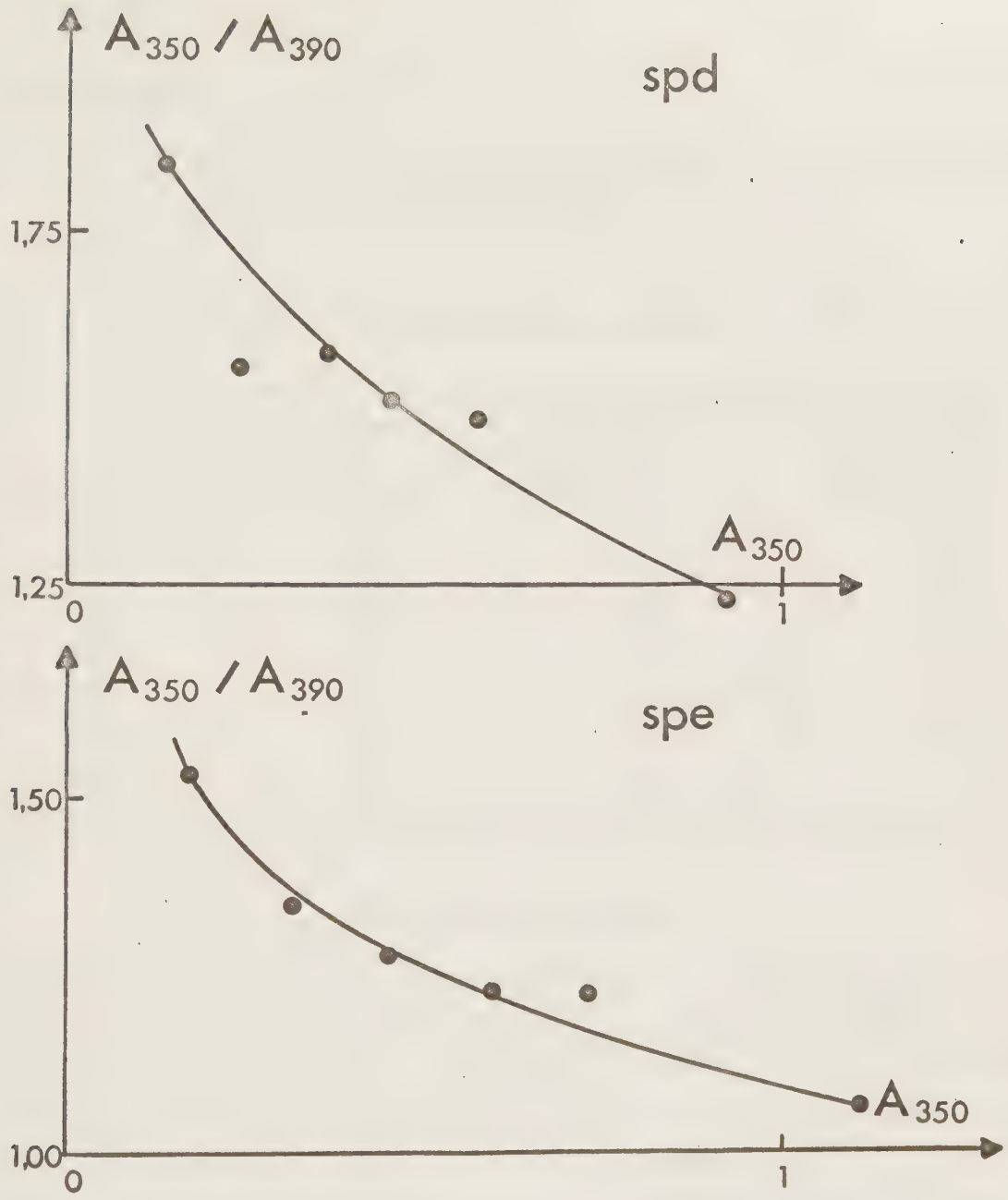


Fig.48. Influence de la valeur de A350, c'est-à-dire de la quantité de polyamine utilisée, sur la valeur de A350/A390.

Les conditions sont celles de Dubin (1960) mais en multipliant tous les volumes par 2.

Tableau XIV.

Valeurs de A350/A390 pour les polyamines de référence et les polyamines isolées.

Polyamines de référence - Valeurs de A350/A390.

	lere expérience (150 neq) dans 0,2 ml	2eme expérience (150 neq) dans 0,2 ml	Valeurs Dubin (100 neq) dans 0,1 ml
DAP	2,05		2,10
PUT	2,21	2,05	2,10
CAD	2,25	2,12	2,20
IBP	1,58		1,53
SPD	1,48	1,38	1,49
SPE	1,28	1,16	1,24

Polyamines isolées.

	lere expérience			2eme expérience		
	A350	A390	A350/A390	A350	A390	A350/A390
$X_{\ell 1}$	0,509	0,337	1,51	0,959	0,648	1,48
$X_{\ell 2}$	0,0630	0,0362	1,74	0,0996	0,0605	1,65
$Y_{\ell 1}$	0,375	0,2636	1,42	0,475	0,342	1,39
$Y_{\ell 2}$	0,2676	0,1427	1,875	0,495	0,2716	1,825
Z_{ℓ}	0,589	0,297	1,985	0,523	0,2676	1,95

Les conditions sont celles de Dubin (1960) mais en multipliant tous les volumes par 2.

- la valeur de $A350/A390$ pour $Y_{\ell 1}$ est très voisine de celle de la spermidine, ce qui confirme donc les données chromatographiques;
- en ce qui concerne $X_{\ell 1}$, l'écart avec la spermine est relativement grand mais s'explique peut-être par une contamination;
- enfin, les données acquises ne fournissent aucune information relative à l'identité de $X_{\ell 2}$ et $Y_{\ell 2}$.

Puisque ces produits n'apparaissent qu'en présence de lysine, il était logique de supposer qu'ils en dérivent. Cette hypothèse a été testée par culture de la levure sur ^{14}C lysine et analyse de la fraction polyamines; le marquage de $X_{\ell 2}$, $Y_{\ell 2}$ et Z_{ℓ}, fournirait un indice important puisque la lysine n'étant pas sensiblement dégradable, ne conduit pas à un marquage généralisé de la cellule. Dans ces conditions, les taches X et Y et peut-être Z sont marquées (figure 49). Cependant, la radioactivité présente dans ces taches est très faible (inférieure à 0,1 % de la radioactivité intracellulaire); d'autre part, il n'a pas été possible de préciser la partie des taches X et Y qui porte cette radioactivité. Nous ne pouvons donc pas exclure totalement que ce soient la spermidine et la spermine qui soient marquées par synthèse à partir d'impuretés de la ^{14}C L-lysine ($<$ 1 %).

Les données acquises permettent certaines hypothèses qui seront développées au cours de la discussion; cependant, il subsiste dans cet ensemble certaines incohérences comme la mauvaise concordance des valeurs de $A350/A390$ de $X_{\ell 1}$, et de la spermine, qui pourraient résulter de ce que certaines taches ne seraient pas doubles mais triples. D'autre part, il reste à

....

Fig.49. Chromatogrammes des polyamines des cellules cultivées en présence de lysine et les autoradiogrammes correspondants.

Mélange Morris et Pardee (1966)

Elution continue 55 h

Autoradiographie sur papier Kodirex 15 j.

confirmer l'identification de X_{l2} et Y_{l2}. Nous essayons actuellement d'améliorer la méthode de séparation, de façon à pouvoir caractériser les substances isolées par détermination des points de fusion des picrates et par spectrographie de masse.

6.4. RELATIONS ENTRE LYSINE, MODIFICATION DU SPECTRE DES POLYAMINES ET EFFET SUR LA CROISSANCE.-

Dans l'impossibilité actuelle de doser facilement les différentes polyamines dans diverses situations physiologiques et à plus forte raison de tester directement leur effet sur la croissance et les métabolismes, il reste à rechercher des indices de l'implication de la perturbation du spectre des polyamines dans le phénomène étudié.

Les taches X et Y ont été dosées et le rapport X/Y déterminé dans diverses situations physiologiques (tableau XV) La lysine élève à la fois la valeur du rapport X/Y (de 0,2 à 0,5) et les valeurs absolues des composants; l'α-aminoadipate fait de même. La souche 04-23-04 qui est résistante à la lysine sur W_1 mais non sur F_3 présente un X/Y élevé, même en l'absence de lysine, et cet acide aminé élève la valeur absolue de X et Y.

Enfin, sachant qu'on attribue aux polyamines un rôle régulateur sur la biosynthèse des protéines et des RNA (voir paragraphe I.4.4.), nous avons testé les effets de la lysine sur ces métabolismes. Dans les conditions de carence azotée dans lesquelles se manifeste l'effet lysine, cet acide aminé stimule la biosynthèse des RNA (figure 50) et freine celle des protéines (figure 5I); il réalise donc un véritable découplage des deux biosynthèses.

6.5. DISCUSSION DU CHAPITRE VI.-

6.5.1.-

La spermidine et la spermine ajoutées au milieu de culture exercent, chez la souche sauvage, une action protectrice assez nette à l'égard de l'effet lysine; toutefois cette action dépend étroitement du pH, ce qui étant donné l'effet du pH sur la perméation, rend les interprétations délicates.

Souche	Milieu	poids sec g/ml	X moles/g	Y moles/g	X/Y
sauvage	F_3	3.300	0.44	2.20	0.20
sauvage	F_3 lys_5	2.300			0.55
sauvage	F_3 $arg_{2,5}$	3.970	0.30	1.46	0.20
sauvage	F_3 AA5	1.190	1.42	4.68	0.31
04-23-04	F_3	3.460	0.72	1.56	0.46
04-23-04	F_3 lys_5	2.690	1.72	3.42	0.50

Tableau XV.

Comparaison de X et Y dans quelques situations physiologiques.

Les milieux sont inoculés à 50 µg/ml, sauf le milieu au L-α-aminoadipate (αAA) qui est inoculé à 200 µg/ml. La récolte est effectuée après 24 h.

Pour la souche sauvage sur F_3 lys_5 un accident a fait perdre une partie de l'échantillon de sorte que seul le rapport est utilisable.

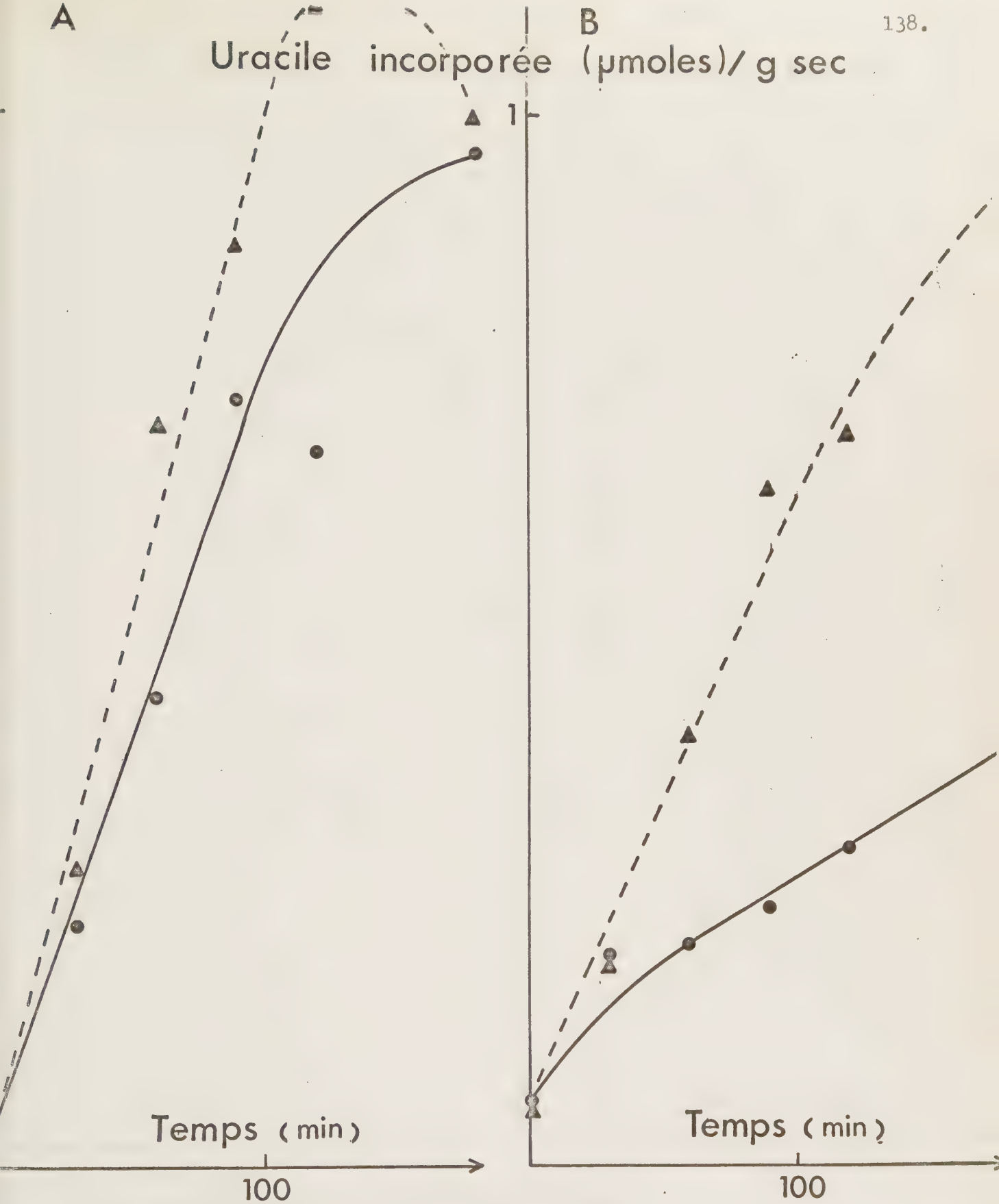


Fig.50 Incorporation de l'uracile marquée.

A : W_3 complet ; B : W_3 sans NH_4^+ ; —●— sans lysine ; —▲— lysine 1 mM.

L'addition de ^{14}C uracile 5 M (0,25 Ci/ml) a lieu 2 h après transfert.
Vitesse d'incorporation calculées : W_3 complet 104 nmoles/g. min ; W_3 complet + lysine 77 nmoles/g. min ; W_3 sans NH_4^+ 6,0 nmoles/g.min ; W_3 sans NH_4^+ + lysine 1,1 nmoles/g. min.
Une expérience identique a donné : sur W_3 sans NH_4^+ 2,8 nmoles/g.min ; sur W_3 sans NH_4^+ +lysine 0 nmoles/g. min.

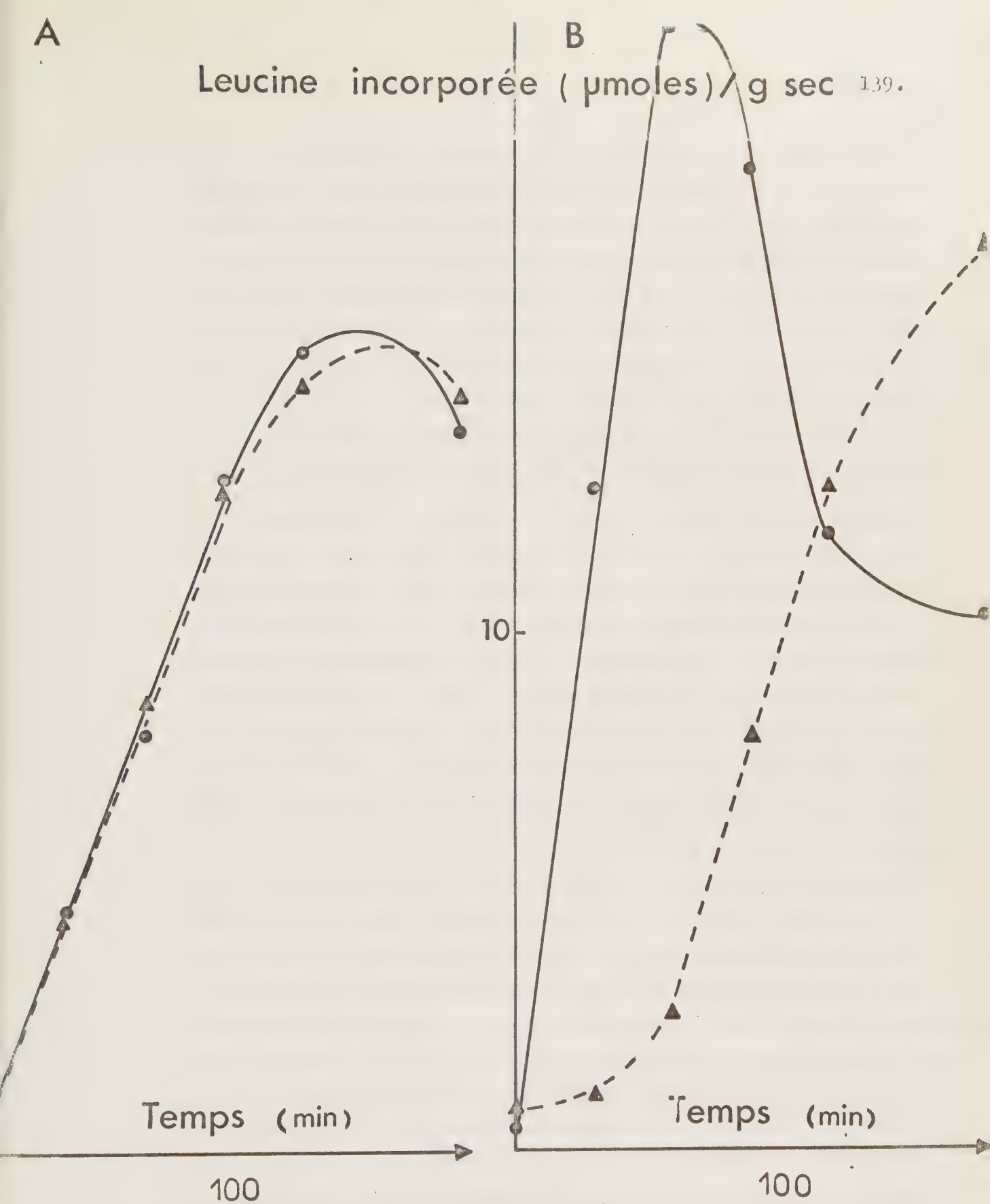


Fig.51. Incorporation de la leucine marquée.

A : W_3 complet ; B : W_3 sans NH_4^+ ; —●— sans lysine ; —▲— lysine 1 mM.

L'addition de ^{14}C leucine 100 mM (0,25 Ci/ml) a lieu 2 h après transfert.
Vitesses d'incorporation calculées : W_3 complet et W_3 complet + lysine 1,4 moles/g. min ; sur W_3 sans NH_4^+ 0,40 moles/g. min ; sur W_3 sans NH_4^+ + lysine 0,084 moles/g. min.

Une expérience identique a donné : sur W_3 sans NH_4^+ : 0,256 moles/g. min

sur W_3 sans NH_4^+ + lysine : 0,145 moles/g. min.

L'essai de remédier à l'inhibition de croissance engendrée chez l'arginase déficient 02-25, et le double mutant ornithine-arginase déficient 12-01 par l'addition d'arginine ou de lysine, a fourni des résultats particulièrement remarquables. Davis et all. (I970) ont obtenu chez Neurospora une protection contre cet effet, par addition au milieu de spermidine, putrescine ou ornithine. Or, nous avons effectivement observé un effet protecteur de l'ornithine, mais aucun effet de la putrescine et un effet fortement inhibiteur de la spermidine et de la spermine, Le fait que l'ornithine soit efficace et que la spermidine et la spermine aient un effet chez la souche sauvage et les deux mutants, mais que la putrescine n'ait rigoureusement aucun effet dans tous les cas, des pH 5 à 8 (pH finaux 3,5 à 7) et des concentrations 1 à 10 mM, suggère que la cellule de S. cerevisiae n'est pas perméable à la putrescine; c'est en contradiction avec les données de Weaver et Hebst (I958), mais ce peut être une particularité raciale. Il est cependant vraisemblable que l'ornithine agit par sa transformation en putrescine; la régulation du métabolisme des polyamines présente en effet chez E. coli la particularité suivante : une carence en putrescine se traduit par une élévation du taux de spermidine (Inouye et Pardee, I970; Morris et Jorstad, I970) et peut-être de spermine, ce qui résulte vraisemblablement d'une action négative exercée par la putrescine sur les enzymes de synthèse de la spermidine : chez certains mutants, une baisse de 99 % du taux de putrescine s'accompagne ainsi d'une élévation de 50 % du taux de spermidine (Morris et Jorstad, I970); or, selon Inouye et Pardee (I970) la division n'a lieu que pour une valeur du rapport moléculaire $\frac{\text{putrescine}}{\text{spermidine}}$ au moins égale à 4. Si un mécanisme analogue

....

existe chez S. cerevisiae, les faits observés s'expliquent parfaitement : les mutants étudiés sont carencés en putrescine, conditionnellement dans le cas de l'arginase-déficient, toujours dans le cas du double mutant; cette carence est supprimée par l'ornithine, non par la putrescine elle-même qui ne pénètre pas; en revanche, la spermidine et la spermine accroissent le déséquilibre entre putrescine et spermidine et renforcent le blocage de croissance. L'existence d'un certain antagonisme entre lysine d'une part, spermidine et spermine d'autre part, mise en évidence par ces mêmes expériences, semble présentement inexplicable.

Remarquons que le double mutant étudié présente un grand intérêt pour une étude éventuelle des effets de la carence en polyamines et que, d'ores et déjà, son comportement permet d'affirmer que les levures sont très sensibles aux carences en polyamines.

6.5.2.- L'analyse des polyamines intracellulaires a permis de mettre en évidence les faits suivants :

- les diamines, les triamines et les tétramines sont représentées dans la cellule.
- les concentrations absolues et les proportions relatives de chaque famille sont influencées par la présence de lysine, le fait le plus saillant étant l'élévation de la concentration en tétramines, qui se manifeste en fin de phase exponentielle en présence de lysine.
- il apparaît en présence de lysine de nouvelles polyamines baptisées provisoirement $X_{\ell 2}$, $Y_{\ell 2}$, Z_{ℓ}, dont l'identité n'a pu encore être déterminée de façon certaine.
  L'hypothèse qui semble la plus vraisemblable est que ces amines sont les homologues dérivés de la lysine de la série dérivée de l'ornithine.
  Les arguments en faveur de cette hypothèse sont :

....

- la découverte récente, dans les cellules d'une souche d'E. coli déficiente en agmatine uréohydrolase, cultivées en présence de lysine, de la cadavérine et de la N-3-aminopropyl-I,5-diaminopentane, c'est-à-dire de l'homologue supérieur de la spermidine (Dion et Cohen, I97I); ces produits semblent d'ailleurs compenser dans une certaine mesure la carence en polyamines de la série ornithine. C'est d'ailleurs cette publication et une communication personnelle de Cohen qui nous ont suggéré cette hypothèse.

- le fait que $Z\ell$ soit identifiée de façon à peu près certaine par la réaction au DNFB comme une diamine, par la chromatographie comme la cadaverine.

- le fait que, lors d'une culture sur ^{14}C lysine, les produits X et Y soient marqués.

- le fait que, lors de la chromatographie sur couche mince sur solvant de Morris et Pardee, $X\ell_2$ et $Y\ell_2$ migrent très légèrement plus loin que la spermine et la spermidine respectivement; or dans une série à nombre fixé de groupements amines, les substances vont d'autant plus loin que leur molécule est plus longue; cela a été vérifié pour les séries diaminopropane, putrescine, cadavérine et imino -bis- propylamine, spermidine (figure 4I).

Les données de Dubin (I960) ne renseignent malheureusement pas sur les propriétés des homologues, mais l'ensemble des faits précédents est, en attendant une identification plus certaine, une indication solide de l'implication des polyamines dérivées de la lysine.

6.5.3.- La relation entre les deux effets de la lysine, la perturbation du spectre des polyamines d'une part, et l'effet sur la croissance d'autre part, est attestée par un certain nombre de faits :

- d'abord, le produit X (essentiellement X_1) atteint sa concentration maximum en fin de phase exponentielle, c'est-à-dire au moment où le blocage se manifeste,
- ensuite, l'analogie de l'effet lysine et de l'effet de l'arginine chez les arginase -déficients, avec antagonisation possible par l'ornithine dans les deux cas, est manifeste.
- ensuite, l' α-aminoadipate exerce sur le rapport X/Y la même influence que la lysine.
- enfin, l'analogie des effets de la lysine sur la biosynthèse des RNA et des protéines et de ceux qu'on attribue habituellement à la spermidine et la spermine, est à noter; c'est-à-dire que lors d'une carence azotée en présence de lysine, la levure se comporte un peu comme une souche "relax" d'E.coli en carence azotée (Cohen et all. 1967). Il est toutefois difficile d'en tirer des conclusions précises par le fait de la complexité de l'action des polyamines, qui varie en particulier en fonction du pH et de la concentration.

Appendice : DEGRADATION DE LA L-LYSINE

Nous avons, au cours du déroulement de ce travail, obtenu quelques informations relatives à l'explication de l'incapacité de S. cerevisiae à utiliser la L-lysine en tant que source d'azote.

Lors des analyses nutritionnelles de mutants lys- , a été vérifié le fait connu (Hwang et all. I966) que la souche sauvage, ainsi que les souches bloquées en aval de l' α-aminoadipate, utilisaient ce produit en tant que source d'azote. C'est donc le passage de la L-lysine à l' α-aminoadipate que S. cerevisiae est incapable de réaliser

Il est intéressant, dans ces conditions, de savoir si la lysine subit cependant une dégradation et quels en sont les produits. L'examen du chromatogramme et de l'autoradiogramme (figure 52) de la fraction acide aminé de l'extrait trichloracétique de cellules cultivées sur ^{14}C - lysine, montre qu'en phase exponentielle, seule la lysine est marquée, mais qu'au delà de cette phase, deux nouvelles taches apparaissent, coïncidant respectivement dans les deux systèmes chromatographiques utilisés (voir paragraphe 2.2.2.), avec la saccharopine et l'acide pipecolique. La voie du pipecolate est effectivement la voie de dégradation générale (cf. paragraphe I.2.3.); en revanche, chez les mammifères, il est possible que la voie principale passe par la saccharopine (Boulanger et all. I969). S. cerevisiae pourrait donc réaliser, par ces deux voies, un début de dégradation rapidement interrompu; toutefois, l'importance quantitative de ces phénomènes n'a pas été étudiée.

Il est remarquable que cette attaque de la lysine n'ait lieu qu'en phase post-exponentielle, c'est-à-dire après épuisement des ions ammonium.

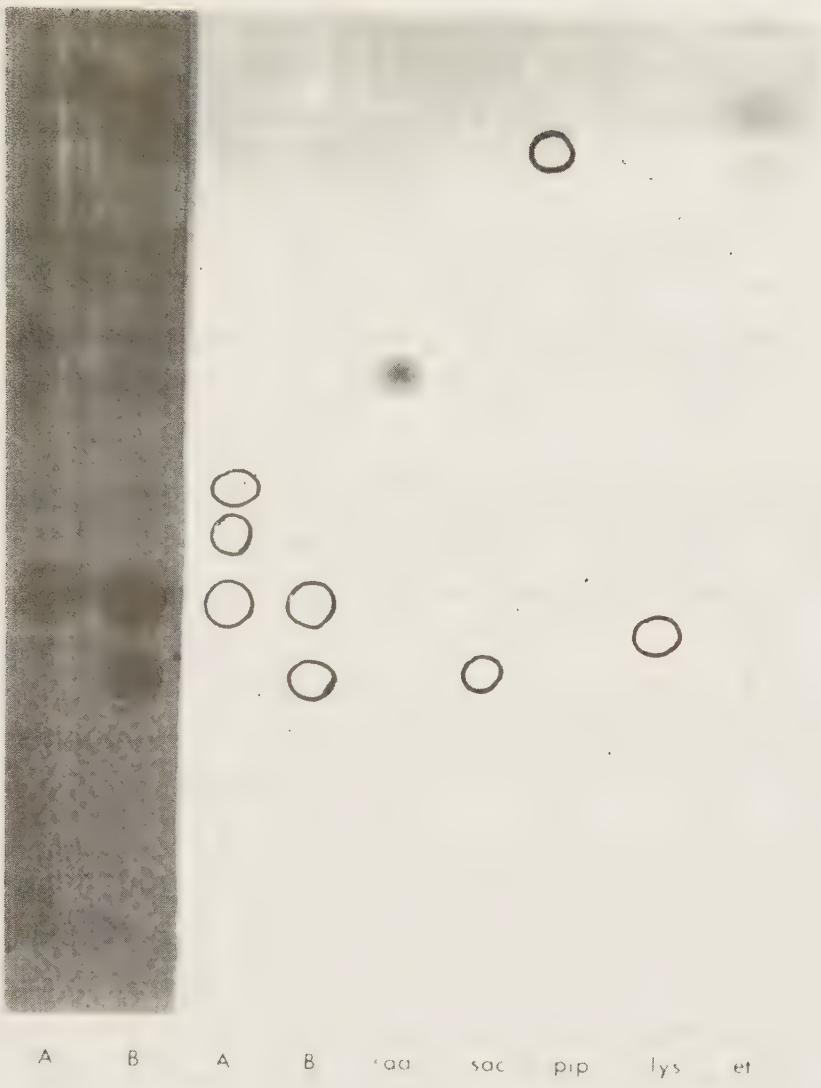


Fig.52. Chromatogramme de la fraction aminoacides et l'autoradiogramme correspondant.

Culture sur W3 lys_1 + ^{14}C lysine.

A - extrait d'une culture en phase exponentielle ;

B - extrait d'une culture en phase post-exponentielle ;

A' et B' - les autoradiogrammes correspondants.

AA : L- -aminoadipate ;

sac : saccharopine ;

pip : acide pipecolique ;

lys : lysine ;

et : mélange d'aminoacides (2,5 nmoles).

Mélange Morris et Pardee (1966).

4 élutions successives.

Autoradiographie sur papier Kodirex, 3 j.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Les résultats des expériences ont été discutés à la fin de chaque chapître. Nous nous bornerons donc à rappeler les apports expérimentaux essentiels de notre travail et à discuter la signification physiologique du phénomène.

- Les principaux faits mis en évidence sont :

- l'inhibition chez certaines levures de l'accroissement cellulaire post-exponentiel sous l'action de la L-lysine;

- l'induction de l'arginase et de l'ornithine transaminase, ainsi que l'inhibition compétitive de l'arginase par ce même acide aminé;

- le fait que le mutant OI-I02 est incapable de réaliser normalement la dérepression corrélative de l'épuisement des sels d'ammonium, par suite vraisemblablement de l'anomalie de régulation du métabolisme des RNA;

- l'inhibition de la croissance des mutants arginase-déficients par l'arginine et la compensation de l'effet lysine par l'ornithine qui montrent que la cause réelle de l'inhibition de croissance est la carence en ornithine;

- le fait que cette carence est due à l'inhibition de la N-acetylglutamokinase, ce qui permet d'obtenir des mutants désensibilisés;

- la possibilité de sélectionner directement des souches résistant à la lysine qui montre l'importance biologique du phénomène étudié,

- la perturbation du spectre des polyamines en présence de lysine consistant essentiellement en l'élévation du taux de spermine , et l'addition aux polyamines habituelles de polyamines particulières, vraisemblablement

.....

dérivées de la lysine. C'est l'origine et les conséquences de ce phénomène qu'il faut discuter plus longuement.

- Signification physiologique.-

La perturbation du métabolisme des polyamines peut en fait avoir deux causes :

- d'une part, en freinant la biosynthèse de l'ornithine, la lysine peut réduire la production de putrescine et par suite dérégler le délicat équilibre existant entre diamines et polyamines,
- d'autre part, le même acide aminé homologue de l'ornithine peut donner naissance à une série homologue de polyamines, dont on peut se demander si elles sont produites par les mêmes enzymes que celles de la série habituelle.

D'ailleurs, le fait de répondre à cette question serait fort important :

- si les enzymes sont les mêmes, il est concevable que l'effet lysine soit la simple conséquence d'une analogie chimique,
- si les polyamines de la série lysine sont produites par des enzymes particulières, c'est que le phénomène a une certaine importance physiologique.

Le fait que les mêmes enzymes soient en jeu est relativement improbable; après une époque où frappé de l'analogie des métabolismes de ces deux substances, on a voulu les faire passer sous l'action des mêmes enzymes, l'ornithine-transaminase par exemple (Scher et Vogel, I957), on a découvert peu à peu que chaque acide aminé disposait de voies propres; si les compétitions entre ces substances sont fréquentes au niveau des sites de régulation, nous ne connaissons pas d'exemple d'enzyme fonctionnant pour le compte de deux métabolismes. Ces considérations renforcent donc l'idée d'une certaine importance physiologique de l'effet lysine.

...

Nous avons déjà rappelé antérieurement les interventions connues de la lysine dans le métabolisme de l'arginine et dans la biosynthèse de la méthionine thréonine; nous avons nous-mêmes apporté des éléments nouveaux au sujet des effets sur le métabolisme de l'arginine. Il résulte de tout ceci que la lysine agit au moins sur deux métabolismes qui ne la concernent pas, mais ce qui est encore plus remarquable c'est que la lysine agit sur la première étape des biosynthèses de l'ornithine et de la méthionine, qui sont à la base de la biosynthèse des polyamines. Tout ceci suggère d'envisager pour la lysine un rôle régulateur d'ensemble.

La recherche d'un "metabolic interlock" du type de ceux décrits par Jensen (I969) ne fournit aucun résultat positif : dans le cas des interactions entre phénylalanine et tyrosine par exemple, il s'agit d'un mécanisme qui empêche que les concentrations de ces deux aminoacides ne soient trop déséquilibrées, ce qui, étant donné leur analogie, risquerait d'entraîner des erreurs métaboliques; mais dans le cas des interractions lysine ornithine, c'est le contraire qui se produit, la lysine freinant la production de son analogue, c'est-à-dire que c'est le mal même auquel remédie l'interlock de Jensen.

Une idée plus prometteuse est celle de la lysine jouant le rôle d'un stimulus chimique déclenchant le passage d'un type de métabolisme à un autre (Demain, I968); du fait de sa non-dégradabilité et de l'absence de régulation de la fin de sa biosynthèse, le pool de lysine se maintient alors que les pools des autres acides aminés s'effondrent (figure 20); le couple ornithine-lysine pourrait représenter un indicateur de l'état du métabolisme azoté, les proportions variant sans doute considérablement lors de la carence azotée et de la carence en un aminoacide. Or, l'antagonisme des deux éléments de ce couple se manifeste en particulier au niveau de la biosynthèse des polyamines, d'une part en réglant la biosynthèse des polyamines dérivées de l'ornithine, d'autre part en permettant ou ne permettant pas l'apparition de polyamines

....

dérivées de la lysine et en particulier de la tétramine.

Quelles sont les conséquences de cette situation ? L'harmonie du métabolisme dépend vraisemblablement d'un équilibre entre les différentes variétés de polyamines; il est possible que l'élévation du taux des triamines et surtout des tétramines qui s'observe en fin de phase exponentielle sur milieu minimum, conséquence vraisemblable du déséquilibre ornithine lysine à tous les niveaux et en particulier au niveau de l'ornithine-décarboxylase, soit le signal du changement métabolique post-exponentiel caractérisé par un ralentissement des synthèses protéïques et nucléïques et par un accroissement du turn-over protéïque; le déséquilibre plus important qui se manifeste en présence de lysine exogène, entraînerait un découplage des biosynthèses des RNA et des protéines, aiguillant une partie non négligeable de l'azote sur la voie nucléïque, et entraînant ainsi une baisse du rendement de la croissance. L'effet lysine ne représenterait alors que l'exagération d'un mécanisme de régulation normal.

BIBLIOGRAPHIE

ABADIE, F. - Ann. Inst. Pasteur, Paris, II3 (I967) 8I.

ABADIE, F. - Ann. Inst. Pasteur, Paris, II5 (I968) I97.

ARCHIBALD, R.M. - J. Biol. Chem. I57 (I945) 507.

BACHRACH, U. - Ann. Rev. Microbiol. 24 (I970) I09.

BACHRACH, U. and WEINSTEIN, A. - J. Gen. Microbiol. 60 (I970) I59.

BACHRACH, U. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 938.

BAÏCH, A. and VOGEL, H.J. - Biochem. Biophys. Res. Commun.7 (I962) 491.

BARTON-WRIGHT, E.C. - Proc. Eur. Brewery Convention Lucerne,(I949)I9

BECHET, J., WIAME, J.M. et GRENSON, M. - Arch. Intern. Physiol. Biochim. 70 (I962) 564.

BECHET, J. and WIAME, J.M. - Dans Comparative biochemistry of arginine and derivatives I964 (G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron, éditeurs), Churchill, London p. I6.

BECHET, J. and WIAME, J.M. - Biochem. Biophys.Res.Commun. 2I (I965) 226.

BECK, CH. and VON MEYENBURG, H.K. - J. Bacteriol. 96 (I968) 479.

BHATTACHARJEE, J.K. - Can. J. Gen. Cytol., I2 (I970) 785.

BOER, H.A.de, RAVE, H.A., GRUBER, G.A.B. and M. - Biochim. Biophys. Acta, 246 (I97I) I57.

BOULANGER, P., OSTEUX, R., JACQUET, E. and CHARLIER, H. Biochim. Biophys. Acta, I84 (I969) 338.

BOURGEOIS, C. - Bull. Soc. Chim. Biol. 5I (I969) 935.

BOURGEOIS, C.M. et THOUVENOT, D.R. - Eur. J. Biochem. I5 (I970) I40

BRADY, B.L. - J. Inst. Brew., London 64 (I958) 304.

BROQUIST, H.P., STIFFEY, A.V. and ALBRECHT, A.M. - Appl. Microbiol. 9 (I96I) I.

BRUNSCHEDE, H. and BREMER, H. - J. Mol. Biol. 57 (I97I) 35.

BUSSEY, H. and UMBARGER, H.E. - J. Bacteriol. I03 (I970) 277.

CHAN, P.Y. and COSSINS, E.A. - F.E.B.S. Letters, I9 (I972) 335.

COHEN, G.N. et MONOD, J. - Bacteriol. Rev. 2I (I957) I69.

COHEN, S.S. and LICHTENSTEIN, J. - J. Biol. Chem. 235 (I960) 2II2

COHEN, S.S., HOFFNER, N., JANSEN, M.,MOORE, M. and RAINA, A. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57 (I967) 72I.

COHEN, S.S. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 869.

COWIE, D.B. and WALTON, B.P. - Biochim. Biophys. Acta, 2I (I956) 2II.

COWIE, D.B. and Mc CLURE, F.T. - Biochim. Biophys. Acta, 3I (I959) 236.

CRABEEL, M. and GRENSON, M. - Eur. J. Biochem. I4 (I970) I97.

CYBIS, J. and WEGLENSKI, P. - Mol. Gen. Genet. I04 (I969) 282.

DANEO-MOORE, L. et SHOCKMAN,G.D- Biochim. Biophys. Acta, I95 (I969) I45.

DAVIS, R.H., LAWLESS, M.B. and PORT, L.A. - J. Bacteriol. I02 (I970) 299.

DE DEKEN, R.H. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 8 (I962) 462.

DE DEKEN, R.H. - Biochim. Biophys. Acta, 78 (I963) 606.

DEMAIN, A.L - Lloydia, 3I (I968) 395.

DION, A.S. and COHEN, S.S. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69 (I972) 2I3.

DIVIES, C. et MORFAUX, J.N. - Ann. Technol. agric. I7 (I968) 355.

DOCTOR, B.P., FOURNIER, M.J. and THORNSVARD, C. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 863.

DUBIN, H.T., - J. Biol. Chem. 235 (I960) 783.

DUTEURTRE, B., BOURGEOIS, C. and CHOLLOT, B. - J. Inst. Brew. 77 (I97I) 28.

ELBACHER, S. and ZELLER, A. - Z. Phys. Chem. 242 (I936) 253.

EXINGER, F. and LACROUTE, F. - C.R. Acad. Sci. Ser. D. 273 (I97I) I573.

EZEKIEL, D.H. and BROCKMAN, H. - J. Mol. Biol. 3I (I968) 54I.

FARAGO,A. and DENES, G. - Biochim. Biophys. Acta, I36 (I967) 6.

FISCHER, F.G. and BOHN, H. - Z. Phys. Chem. 308 (I957) I08.

FJELLSTEDT, T.A. and OGUR, M. - J. Bacteriol. I0I (I970) I08.

FOWELL, R.R. - Nature, London I70 (I952) 578.

FOWELL, R.R., dans The Yeasts, A.H. ROSE and J.S. HARRISON, Academic Press, vol. 1 (I969) 303.

FUKUARA, H. - Biochim. Biophys. Acta, I34 (I967) I43.

GALE, E.F. - Biochem. J. 34 (I940) 392.

GITS, J.J. and GRENSON, M. - Biochim.Biophys. Acta, I35 (I967)507.

GOODMAN, D. - J. Mol. Biol. 5I (I970) 49I.

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. and DAVID, M.M. - J. Biol. Chem. I77 (I949) 75I.

GRADY, - Appl. Microbiol. I8 (I969) 776.

GRENSON, M. - Biochim. Biophys. Acta, I27 (I966) 339.

GRENSON, M., MOUSSET, M., WIAME, J.M. and BECHET, J. - Biochim. Biophys. Acta, I27 (I966) 325.

GRENSON, M. - Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires, 22 (I967), 7.

GRENSON, M., CRABEEL, M., WIAME, J.M. and BECHET, J. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 (I968) 4I4.

GRENSON, M., HOU, C. and CRABEEL, M. - J. Bacteriol. I03 (I970)770

GRENSON, M., and HENNAUT, C. - J. Bacteriol. I05 (I97I) 477.

GROS, F. and GROS, F. - Biochim. Biophys. Acta, 22 (I956) 200.

GUMPORT, R.I. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 9I5.

GUPTA, R.N. and SPENSER, I.D. - J. Biol. Chem. 244 (I969) 88.

HALVORSON, H.O. et COHEN, G.N. - Ann. Inst. Pasteur, 95 (I958) 73.

HALVORSON, H., - Biochim. Biophys. Acta, 27 (I958) 255.

HAMMOND, J.E. and HERBST, E.J. - Anal. Biochem. 22 (I968) 474.

HARTELIUS, V. - C.R. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol. 20 (I934) 1.

HEATHCOTE, J.G. and HAWORTH, C. - J. Chromatogr. 43 (I969) 84.

HEDRICK, L.R. and DUPONT, P.D. - Antonie van Leeuwenhoek, 34 (I968) 465.

HERBST, E.J., GLINOS, E.B. and AMUNDSEN, L.H. - J. Biol. Chem. 2I4 (I955) I75.

HERBST, E.J., WEAVER, R.H. and KEISTER, D.L. - Arch. Biochem. Biophys. 75 (I958) I7I.

HIRSCHFIELD, I.N., ROSENFELD, H.J., LEIFER, Z. and MAAS, W.K. - J. Bacteriol. 101 (I970) 725.

HÖLTTÄ E. and JÄNNE, J. - F.E.B.S. Letters, 23 (I972) II7.

HUNTER, A. and DOWNS, C.E. - J. Biol. Chem. I57 (I945) 427.

HWANG, Y.L., LINDEGREN, G. and LINDEGREN, C.C. - Can. J. Genet. Cytol. 8 (I966) 471.

INOUYE, M. and PARDEE, A.B. - J. Bacteriol. IOI (I970) 770.

INOUYE, M. and PARDEE, A.B. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 90I.

INTIRE, M.C., F.C., CLEMENTS, L.M. and SPROULL, M. Anal. Chem. 25 (I953) I757.

JANNE, J., SCHENONE, A. and WILLIAMS-ASHMAN, H.G. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 (I97I a) 758.

JANNE, J., WILLIAMS-ASHMAN, H.G. and SCHENONE, A. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (I97I b) I362

JAVOR, G.T., RYAN, A., and BOREK, E. - Biochim. Biophys. Acta, I90 (I969) 442.

JOIRIS, C.R. et GRENSON, M. - C.R. Soc. belge de biochimie I4 déc. I968, I54.

JONES, E.E. and BROQUIST, H.P. - J. Biol. Chem. 240 (I965) 253I.

KANE, J.F. and JENSEN, R.A. - J. Biol. Chem. 245 (I970) 2384.

KUTTAN, R., RADHAKRISHNAN, A.N., SPANDE, T. and WITKOP, B. Biochem. IO (I97I) 36I.

LACROUTE, F., PIERARD, A., GRENSON, M. and WIAME, J.M. - J. gen. Microbiol. 40 (I965) I27.

LARUE, T.A. and SPENCER J.F.T. - Antonie van Leeuwenhoek, 34 (I968) I53.

LAZZARINI, R.A. and DAHLBERG, A.E. - J. Biol. Chem. 246 (I97I) 420.

LEBOY, P.S. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 895.

LENNETTE, E.T., MEYNACK, B. and APIRION, D. - F.E.B.S. Letters 2I (I972) 286.

LINDSTEDT, S., LINDSTEDT, G. and MITOMA, C. - Arch. Biochem. Biophys. II9 (I967) 336.

de la LLOSA, P., TERTAIN, C., JUTISZ, M. - J. Chromatogr. I4 (I964) I36.

MAAS, W.K., LEIFER, Z. and POINDEXTER, J. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 957.

MAHLER, H.R. and CORDES, E.H. - Biological Chemistry, Harper and Row, Ltd, London (I966).

MAHLER, H.R. and GREEN, G. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 783.

MANDELSTAM, J. - Biochim. Biophys. Acta, 22 (I956) 324.

MANDELSTAM, J. - Bact. Rev. 2I (I960) 289.

MARAGOUDAKIS, M.E., HOLMES, H. and STRASSMAN, M. - J. Bacteriol. 93 (I967) I677.

MATILE, P. - Antonie van Leeuwenhoek 35, supplément: Yeast Symposium (I969) 59.

MEISTER, A., RADHAKRISHNAN, A.N. and BUCKLEY, S.D. - J. Biol. Chem. 229 (I957) 789.

MESSENGUY, F. et WIAME, J.M. - F.E.B.S. Letters 3 (I969) 47.

MESSENGUY, F., PENNINCKX, M. and WIAME, J.M. - Eur. J. Biochem. 22 (I97I) 277.

MIDDELHOVEN, W.J. - Biochim. Biophys. Acta, 93 (I964) 650.

MIDDELHOVEN, W.J. - Biochim. Biophys. Acta, I56 (I968) 440.

MIDDELHOVEN, W.J. - Biochim. Biophys. Acta, I92 (I969) 243.

MIDDELHOVEN, W.J. - Antonie van Leeuweuhoek, 36 (I970) 1.

MINET, M. - Thèse, Université de Bruxelles (I970).

MØLLER, V., - Acta path. Scand. 36 (I955) I58.

MORGAN, D.H. - Mol. and Gen. Genetics I08 (I970) 29I.

MORRIS, E.O. and EDDY, A.A., - J. Inst. Brew. London, 63 (I957) 34

MORRIS, D.R. and PARDEE, A.B. - J. Biol. Chem. 24I (I966) 3I29.

MORRIS, D.R. and KOFFRON, K.L. - J. Bacteriol. 94 (I967) I5I6.

MORRIS, D.R., KOFFRON, K.L. and OKSTEIN, C.J. - Anal. Biochem. 30 (I969) 449.

MORRIS, D.R. and JORSTAD, C.M. - J. Bact. I0I (I970) 73I.

MORRIS, D.R., HAOWU, W., APPLEBAUM, D. and KOFFRON, K.L. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 968.

PANKO, W.B. and KENNEY, F.T. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (I97I) 346.

PARDEE, A.B. and PRESTIDGE, L. - J. Bacteriol. 7I (I956) 677.

PATTHY, L. and DENES, G. - F.E.B.S. Letters, I7 (I97I) 8I.

PEYNAUD, E. et LAFON-LAFOURCADE, S. - Rev. Ferm. Ind. Alim. I7 (I967) 11.

RAINA, A. - Acta physiol. scand. 60 - supplément 2I8 (I964) 1.

RAINA, A., JÄNNE and SIIMES, M. - Abstracts, 2nd FEBS Meeting, Vienna, I965, A II4.

RAINA, A., JÄNNE and SIIMES, M. - Biochim. Biophys. Acta, I23 (I966) I97.

RAINA, A. and COHEN, S.S. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55 (I966) I587.

RAINA, A., JANSEN, M. and COHEN, S.S. - J. Bacteriol. 94 (I967) I684.

RAINA, A., JÄNNE, J., HANNONEN, P. and HÖLTTÄ, E. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 697.

RAMOS, F., THURIAUX, P., WIAME, J.M. and BECHET, J. - Eur. J. Biochem. I2 (I970) 40.

REBELLO, J.L. and JENSEN, R.A. - J. Biol. Chem. 245 (I970) 3738.

RIBEREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E. - Ann. Nutr. Alim. 20 (I966) 1.

RICKENBERG, H.V., COHEN, G.N., BUTTIN, G. et MONOD, J. - Ann. Inst. Pasteur 9I (I956) 829.

ROBICHON-SZULMAJSTER, H. de - Bull. Soc. Chim. Biol. 49 (I967)I44I.

ROBICHON-SZULMAJSTER, H. de, and SURDIN-KERJAN, Y. - Dans " The Yeasts" (A.H. Rose and J.S. Harrison, éditeurs,) vol. II (I97I) 335. - Academic Press, London and New York.

(*)

ROTHSTEIN, M. - Arch. Biochem. Biophys. 111 (I965) 467.

RUSSELL, D. and SNYDER, S.H. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60 (I968) I420.

RUSSELL, D.H. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 772.

RUSSELL, D.H., MEDINA, V.J. and SNYDER, S.H. - J. Biol. Chem. 245 (I970) 6732.

RUSSELL, D.H. and LOMBARDINI, J.B. - Biochim. Biophys. Acta, 240 (I97I) 273.

RUSSELL, D.H. - Biochem. Pharmacol. 20 (I97I) 348I.

SCHER, W.I., VOGEL, H.J. and J.R. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S , 43 (I957) 796.

SCHULTZ, A.S. and POMPER, S. - Arch. Biochem. I9 (I948) I84.

SCHWEET, R.S., HOLDEN, J.T. and LOWY, P.H. - J. Biol. Chem. 211 (I954) 5I7.

SCHWENCKE, J. and MANGANA-SCHWENCKE, N. - Biochim. Biophys. Acta, I73 (I969) 302.

SIEST, G. - Thèse pharmacie, NANCY (I966).

SIEST, G. et BAGREL, A. - Bull. Soc. Pharm. Nancy, 78 (I968) 40.

SIMS, A.P. and FOLKES, B.F. - Proc. Roy. Soc. Ser B (London) I59 (I964) 479.

SINHA, A.K. and BHATTACHARJEE, J.K. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 39 (I970) I205.

SINHA, A.K. and BHATTACHARJEE, J.K. - Biochem. J. I25 (I97I) 743.

SINHA, A.K., KURTZ,M. and BHATTACHARJEE, J.K. - J. Bacteriol. I08 (I97I) 7I5.

(*) ROTH, R.M. and DAMPIER, C.- J. Bacteriol. I09 (I972) 773.

SMITH, T.A. - Endeavour 3I (I972) 22.

SNEATH, P.H.A. - Nature, I75 (I955) 8I8.

SNOW, R. - Nature, 211 (I966) 206.

SNYDER, S.H., KREUZ, D.S., MEDINA, V.J. - Ann. N.Y. Acad. Sci. I7I (I970) 749.

SRB, A.M., FINCHAM, J.R.S. and BONNER, D. - Am.J. Botany, 37 (I95C 533.

STADTMAN, E.R., COHEN, G.N., LEBRAS, G. and ROBICHON-SZULMAJSTER, H J. Biol. Chem. 236 (I96I) 2033.

STADMAN, T.C. and RENZ, P. - Arch. Biochem. Biophys. I25 (I968) 22

STASTNY, M. and COHEN, S. - Biochim. Biophys. Acta, 204 (I970) 578

STENT, G. and BRENNER, S. - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 47 (I96I) 2005.

STUBBS, J.D. and STUBBS, E.A. - J. Mol. Biol. 5I (I970)7I7.

SURDIN, Y., SLY, W., SIRE, J., BORDES, A.M. et ROBICHON - SZULMAJSTER, H. de - C.R. Acad. Sci. Paris 258 (I964) 5046.

SURDIN, Y., SLY, W., SIRE, J., BORDES, A.M. et ROBICHON - SZULMAJSTER, H. de - Biochim. Biophys. Acta, I07 (I965) 546.

SUSSMAN, A.J. and GILVARG, C. - J. Biol. Chem. 244 -(I969) 6304.

TABOR, H., ROSENTHAL, S.M. and TABOR, C.W. - Fed.Proc.I5 (I956) 36

TABOR, H., ROSENTHAL, S.M. and TABOR, C.W. - J. Amer.Chem. Soc. 79 (I957) 2978.

TABOR, H., ROSENTHAL, S.M. and TABOR, C.W. - J. Biol. Chem. 233 (I958) 907.

TABOR, H., TABOR, C.W. and ROSENTHAL, S.M. - Ann. Rev. Biochem.30 (I96I) 579.

TABOR, H., and TABOR, C.W. - Ann. Rev. Pharmacol. I6 (I964) 247.

TABOR, C.W.,and TABOR, H. - J. Biol. Chem. 24I (I966) 37I4.

TABOR, H. and TABOR, C.W. - J. Biol. Chem. 244 (I969), 2286.

TABOR, C.W. and DOBBS, L.G. - J. Biol. Chem. 245 (I970), 2086.

THORNE, R.S.W. - J. Inst. Brew. (I94I) 255.

THOUVENOT, D. - Thèse, Nancy (I97I).

THOUVENOT, D.R. et BOURGEOIS, C.M. - Ann. Inst. Pasteur, I20 (I97I) 6I7.

THURIAUX, P., RAMOS, F., WIAME, J.M., GRENSON, M. et BECHET, J. Arch. Intern. Physiol. Biochim. Belgique, 76 (I968), 955.

THURIAUX, P. - Thèse, Bruxelles (I969).

TRUPIN, J.S. and BROQUIST, H.P. - J. Biol. Chem. 240 (I965) 2524.

UDAKA, S. and KINOSHITA, S.H. - Gen. Appl. Microbiol. 4 (I958) 27:

UMBARGER, H.E. - Ann. Rev. Biochem. 38 (I969) 323.

VOGEL, H.J. - Proc' Nat. Acad. Sci. U.S. 39 (I953) 578.

VOGEL, H.J. and BONNER, D.M. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 40 (I954) 688.

VOGEL, H.J. and Mc LELLAN, W.L. - Methods in Enzymology, I7 (I970) 25I.

WALTERS, L.S. and THISELTON, H.R. - J. Inst. Brew. London, 59 (I953) 40I.

WEAVER, R.H. and HERBST, E.J. - J. Biol. Chem. 23I (I958) 637.

WIAME, J.M. and STORCK, R. - Biochim. Biophys. Acta, I0 (I953) 268

WIAME, J.M. - Current topics in cellular regulations. Vol. 4 (I97I) Academic Press. Inc. New York and London.

WIAME, J.M. - Report of the Xth Congress of Microbiology, Mexico I970, Recent advances in microbiology 3I (I97I) 243.

WICKERHAM, L.J. - U.S. Dept. Agriculture Technical Bull. I95I,I029

WITKIN, S.S. and ROSENBERG, E. - J. Bacteriol. I03 (I970) 64I.

YURA, T. and VOGEL, H.G. - J. Biol. Chem. 234 (I959) 339.

ZISHKA, M.K. and NISHIMURA, J.S. - Anal. Biochem. 34 (I970) 29I.